

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR

EVALDO CARLOS DA SILVA

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E FORMULAÇÃO DE AMILASE E SUA APLICAÇÃO
EM PANIFICAÇÃO**

CURITIBA

2017

EVALDO CARLOS DA SILVA

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E FORMULAÇÃO DE AMILASE E SUA APLICAÇÃO
EM PANIFICAÇÃO**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Concentração em Agroindústria e Biocombustíveis, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná como requisito para à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Porto de Souza Vandenberghe

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2017

SI586p

Silva, Evaldo Carlos da

Produção, purificação e formulação de amilase e sua aplicação em panificação / Evaldo Carlos da Silva. – Curitiba, 2017.

165 f. : il. color. ; 30 cm.

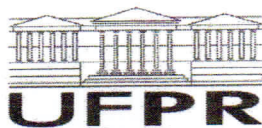
Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2017.

Orientadora: Luciana Porto de Souza Vandenberghe.

Coorientador: Carlos Ricardo Soccol.

1. α -amilase. 2. Amilase. 3. *Aspergillus oryzae*. 4. Indústria de panificação. 5. Trigo.
I. Universidade Federal do Paraná. II. Vandenberghe, Luciana Porto de Souza. III. Soccol, Carlos Ricardo. IV. Título.

CDD: 664.752



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **IVALDO CARLOS DA SILVA** intitulada: **PRODUÇÃO, SEPARAÇÃO, PURIFICAÇÃO E FORMULAÇÃO DE AMILASE E SUA APLICAÇÃO EM PANIFICAÇÃO**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua A PROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Luciana Porto de Souza Vandenberghe
LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE

Curitiba, 09 de Junho de 2017.

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

Valcineide Oliveira de Andrade Tanobe
VALCINEIDE OLIVEIRA DE ANDRADE TANOBE
Avaliador Externo (UFPR)

Maria Giovana Binder Pagnoncelli
MARIA GIOVANA BINDER PAGNONCELLI
Avaliador Externo (UFPR)

Susan Grace Karp
SUSAN GRACE KARP
Avaliador Interno (UFPR)

Carlos Ricardo Soccol
CARLOS RICARDO SOCCOL
Co-orientador - Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir o enfrentamento de cada desafio, por toda proteção e bênçãos, especialmente nos momentos adversos.

À orientadora deste trabalho, Prof.^a Dr.^a Luciana P. S. Vandenberghe, toda minha admiração e gratidão e obrigado pela confiança, apoio, orientações e por acreditar em mim.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, pelas oportunidades, palavras de incentivo, por acreditar, confiar e oportunizar a realização desta pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Vanete Thomaz Soccol pela atenção, colaboração, ensinamentos e esforços aplicados na realização desta pesquisa.

Aos Professores (as) do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia Dr.^a Adriane B. P. Medeiros, Dr. Júlio César de Carvalho, Dr. Luiz A. Júnior Letti e Dr.^a Adenise L. Woiciechowski, Dr.^a Cristine Rodrigues, Dr.^a Valcineide Tanobe, pelas oportunidades, orientações e ensinamentos.

À banca avaliadora desta Tese: Prf.^a Dr.^a Maria Giovana Binder Pagnoncelli, Prf.^a Dr.^a Susan Karp, Prf.^a Dr.^a Valcineide Tanobe, Prf.^a Dr.^a Cristine Rodrigues, pelo tempo dedicado às correções e importante contribuição.

À minha mãe e meu pai, Luiza e José, pela educação, e amor incondicional...

Ao Sergio pela paciência, incentivo e compreensão.

A todos os colegas do laboratório, com quem partilhei momentos de alegrias, ansiedades e descontração nos últimos tempos. Em especial a Mitiyo F. Miyaoka e Otacílio P. Tomaz Junior.

À Ana Cristina Niculitcheff e Patrícia Almeida e todos os funcionários da empresa Granotec do Brasil. Foi um grande aprendizado poder trabalhar com vocês, obrigado pelo trabalho competente e por me receberem com tanta atenção.

Aos amigos (as) Will, Lenize, Maria José, Elisabete, Juliana, Joseane Halekessandra e Valdo pelo apoio e suporte na minha ausência. Muito Obrigado.

Ao apoio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À empresa Granotec do Brasil pelo envio das amostras, e por viabilizar e realizar as aplicações em escala industrial.

A todos que contribuíram para a conclusão desta pesquisa, muito obrigado!

RESUMO

Enzimas são moléculas de proteína que atuam como catalisadores especializados para reações químicas. Elas têm contribuído muito para a indústria tradicional e moderna, melhorando os processos existentes. Neste trabalho, direcionamos o foco nas aplicações técnicas, indústria de panificação. Embora as aplicações de enzimas estejam em pleno andamento, são necessários avanços para superar suas fraquezas na manutenção de atividades durante os processos catalíticos. A otimização da produção de α -amilase (E.C.3.2.1.1) a partir de fungo *Aspergillus oryzae* LPB 5593, utilizando um subproduto da moagem de trigo (amido) como única fonte de carbono, foi realizada por fermentação submersa (FSm). A investigação de nutrientes quanto à sua influência na produção de α -amilase foi realizada por meio de um desenho DCCR (Delineamento Central Composto Rotacional) tipo 3⁴. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uréia e peptona foram selecionados com base na sua influência positiva como fonte de nitrogênio na produção de enzimas. A concentração de nutrientes otimizada produziu aumento da expressão de α -amilase de 199 U.mL⁻¹ para 768 U.mL⁻¹. A enzima foi separada e concentrada em sistema de ultrafiltração por membranas Pellicon 2. Os estudos de formulação e estabilidade para conservação da atividade enzimática prolongaram a estabilidade da enzima em 79,43% por 120 dias sob refrigeração com utilização polietilenoglicol (PEG) 1% e sorbitol 5% em massa. A aplicação da α -amilase em pó foi realizada em panificação com objetivo de melhorar as propriedades reológicas da farinha de trigo de modo a aumentar a qualidade nas características de cor, volume, maciez, crocância e vida de prateleira. As concentrações utilizadas foram de 20 ppm e 30 ppm com valores satisfatórios (volume de 9,2 cm³) e semelhantes aos fornecidos pela enzima comercial (volume de 9,1 cm³).

Palavras-chave: amilase, α -amilase, fermentação submersa, *Aspergillus oryzae*, indústria de panificação, trigo.

ABSTRACT

Enzymes are protein molecules that act as specialized catalysts for chemical reactions. They have contributed a lot to the traditional and modern industry, improving existing processes. In this work, we focus the technical applications, baking industry. Although enzyme applications are in full swing, advances are needed to overcome their weaknesses in maintaining activities during catalytic processes. The optimization of α -amylase production (E.C.3.2.1.1) from fungus *Aspergillus oryzae* LPB 5593, using a by-product of wheat (starch) milling as sole source of carbon, was performed by submerged fermentation (FSm). The nutrient investigation for its influence on α -amylase production was performed using a DCCR (Rotational Composite Central Design) type 3⁴. (NH₄)₂SO₄ design, urea and peptone were selected based on their positive influence as a source of in the production of enzymes. Optimized nutrient concentration produced increased α -amylase expression from 199 U.mL⁻¹ to 768 U.mL⁻¹. The enzyme activity was separated and concentrated in a Pellicon 2 membrane ultrafiltration system. The formulation and stability studies for the conservation of the enzymatic activity extended the enzyme estability by 79.43% for 120 days under refrigeration using 1% polyethylene glycol (PEG) and sorbitol 5% by weight. The application of α -amylase powder was carried out in baking in order to improve the rheological properties of wheat flour in order to increase the quality in the characteristics of color, volume, softness, crispness and shelf life. The concentrations used were 20 ppm and 30 ppm with satisfactory values (volume 9.2 cm³) and similar to those provided by the commercial enzyme (volume 9.1 cm³).

Keywords: amylase, α -amylase, submerged fermentation, *Aspergillus oryzae*, bakery industry, wheat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

FIGURA 1.1 – AÇÃO DAS AMILASES SOBRE A CADEIA DO AMIDO	25
FIGURA 1.2 - (A) ESTRUTURA PARCIAL DA AMIOSE E (B) ESTRUTURA PARCIAL DA AMILOPECTINA FORMANDO LIGAÇÕES A-1,6 NAS RAMIFICAÇÕES. FONTE: CAUVAIN (2003).....	26
TABELA 1.1 - PRODUÇÃO DE A-AMILASES POR DIFERENTES GÊNEROS DE BACTÉRIAS	29
TABELA 1.2 - PRODUÇÃO DE A-AMILASES POR DIFERENTES GÊNEROS DE FUNGOS.....	30
TABELA 1.3 - ÁREAS DE APLICAÇÕES DE AMILASES	31
FIGURA 1.3 – EFEITOS DA APLICAÇÃO DA AMILASE NA PRODUÇÃO DE PÃES.....	34
TABELA 1.4 - ENZIMAS UTILIZADAS EM PANIFICAÇÃO.	35

CAPÍTULO II

TABELA 2.1 - CEPAS INVESTIGADAS PARA PRODUÇÃO DE A-AMILASE	52
FIGURA 2.1 - SELEÇÃO QUALITATIVA DE CEPAS PRODUTORAS DE A-AMILASES (FONTE: O AUTOR, 2017)	53
FIGURA 2.2. ESQUEMA GERAL DAS ETAPAS REALIZADAS PARA A SELEÇÃO DE CEPAS PARA A PRODUÇÃO DE A-AMILASE (FONTE: O AUTOR, 2017).....	54
TABELA 2.2. NÍVEIS DOS FATORES AVALIADOS NO ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE A-AMILASE POR <i>A. ORYZAE</i> NRRL 5593 EM FSM.....	57
FIGURA 2.3 - BIORREATOR MODELO MDL 750 (B. E. MARUBISHI THAILAND CO. LTDA.), UTILIZADO PARA PRODUÇÃO DE A-AMILASE POR FSM	58
FIGURA 2.4 - A) BIORREATOR DO TIPO COLUNA DE BOLHAS PROJETADO NO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA. B) PROJETO DO BIORREATOR DE 1,5 L COM RESPECTIVAS MEDIDAS FONTE: OLIVEIRA (2012).....	59

FIGURA 2.5 - DEGRADAÇÃO DO AMIDO PELA AMILASE PRODUZIDA POR <i>ASPERGILLUS</i> <i>ORYZAE</i> LPB 5593	61
TABELA 2.3 - SELEÇÃO QUALITATIVA DE CEPAS PARA A PRODUÇÃO DE A-AMILASE.....	62
FIGURA 2.6 - VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DAS CEPAS TESTADAS PARA A PRODUÇÃO DE A-AMILASE EM MEIO À BASE DE AMIDO.....	63
TABELA 2.4 - SELEÇÃO QUANTITATIVA DE CEPAS PARA A PRODUÇÃO DE A-AMILASE.....	64
FIGURA 2.7 - UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES PERCENTUAIS DE AMIDO (1%, 1.5%, 2%, 2.5% E 3%) PARA PRODUÇÃO DE AMILASE	66
FIGURA 2.8 - OTIMIZAÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO EM MEIO PADRÃO, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, UREIA E PEPTONA PARA PRODUÇÃO DE A-AMILASE	67
TABELA 2.5 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO DCCR PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE AMILASE POR FSM.....	69
FIGURA 2.9. GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DAS VARIÁVEIS TESTADAS SOBRE A PRODUÇÃO DE A-AMILASE	70
FIGURA 2.10. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE URÉIA E AMIDO SOBRE A PRODUÇÃO DE A-AMILASE.....	71
FIGURA 2.11. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PEPTONA E AMIDO SOBRE A PRODUÇÃO DE A-AMILASE	72
FIGURA 2.12. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE A-AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM FRASCOS ERLNMEYER POR <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i> LPB 5593. (AE: ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA A-AMILASE, AR: AÇÚCARES REDUTORES)	73
TABELA 2.6. PRODUÇÃO DE A-AMILASE POR FSM COM 2,5% (M/V) DE AMIDO EM BIORREATOR DO TIPO STR UTILIZANDO DIFERENTES TAXAS DE AGITAÇÃO E AERAÇÃO	74
FIGURA 2.13. ESTUDO CINÉTICO DE PRODUÇÃO DE A-AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR DO TIPO STR UTILIZANDO DIFERENTES CONDIÇÕES DE AGITAÇÃO E AERAÇÃO.	75

FIGURA 2.14. ESTUDO CINÉTICO DE PRODUÇÃO DE A-AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR DO TIPO STR UTILIZANDO DIFERENTES CONDIÇÕES DE AGITAÇÃO E AERAÇÃO.	75
FIGURA 2.15. PRODUÇÃO DE A-AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR DO TIPO STR	76
FIGURA 2.16. PRODUÇÃO DE A-AMILASE POR FSM EM BIORREATOR DO TIPO COLUNA DE BOLHAS (BCR).	77
FIGURA 2.17. PRODUÇÃO DE A-AMILASE POR FSM UTILIZANDO MEIO SINTÉTICO AMIDO (2,5%, M/V) E <i>A. ORYZAE</i> LPB 5593 EM BIORREATOR BCR.....	78
TABELA 2.7. OPERAÇÕES DE SEPARAÇÃO/PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO EM SISTEMA PELLICON II.....	80
FIGURA 2.18. ELETROFORESE DAS FRAÇÕES OBTIDAS NO PROCESSO DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO. MM: CORRESPONDENTE AO MARCADOR MOLECULAR; 1: RETIDO 100 KDA; 2: PERMEADO 100 KDA; 3: RETIDO DE 10 KDA; 4: PERMEADO DE 30 KDA E 5 E 6: RETIDO MEMBRANA 30 KDA.....	81

CAPÍTULO III

TABELA 3.1. ADITIVOS UTILIZADOS NA ETAPA DE PRÉ-SELEÇÃO DE COMPONENTES PARA FORMULAÇÃO DE AMILASES PRODUZIDAS EM FSM POR <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i> LPB 5593	93
TABELA 3.2. NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS PARA A AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE ADITIVOS PARA FORMULAÇÃO DE AMILASE PRODUZIDA EM FSM POR <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i> LPB 5593	94
FIGURA 3.1. ESQUEMA DE SECAGEM DO EXTRATO AMILOLÍTICO POR SPRAY-DRYER.....	95
FIGURA 3.2. ESTUDO DA ATIVIDADE AMILOLÍTICA DO EXTRATO PURIFICADO PRODUZIDA POR <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i> NRRL 5593 POR FSM EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO: REFRIGERAÇÃO (4°C), TEMPERATURA AMBIENTE (A) E ESTUFA (37°C).....	97

FIGURA 3.3. EFEITO DOS DIFERENTES ADITIVOS NA ATIVIDADE DA AMILASE. A PRIMEIRA COLUNA REPRESENTA O EFEITO DA MEIA CONCENTRAÇÃO [C] E A SEGUNDA REPRESENTA A MÁXIMA CONCENTRAÇÃO PERMITIDA [2C]. ACC – ÁCIDO CÍTRICO, ACB – ÁCIDO BENZOICO, MBNA – METABISSULFITO DE SÓDIO, GROL – GLICEROL, MNT – MANITOL, CITNA – CITRATO DE SÓDIO, PEG400 – POLIETILENOGLICOL, SBT – SORBITOL, XOSE – XILOSE, SOSE – SUCROSE.	99
TABELA 3.3. INFLUÊNCIA DOS ADITIVOS ÁCIDO BENZOICO, PEG 400 E SORBITOL SOBRE ATIVIDADES RESIDUAIS DE A-AMILASE.	101
FIGURA 3.4. DIAGRAMA DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS SIGNIFICATIVOS DOS ADITIVOS ACB, PEG 400 E SBT NA CONSERVAÇÃO DA ATIVIDADE DE AMILASE.....	102
FIGURA 3.5. ATIVIDADE AMILÁSICA RESIDUAL COMPARANDO AMOSTRAS FORMULADAS COM ADITIVOS (A) E (R) E NÃO-FORMULADAS (AC) E (RC).....	103
FIGURA 3.6 - ESTABILIDADE DE AMILASE EM PÓ OBTIDA POR SPRAY-DRYING.....	105
FIGURA 3.7 MICROGRAFIA ELETRONICA DE VARREDURA DA COMBINAÇÃO 20% MALTODEXTRINA COM 5% DO EXTRATO ENZIMÁTICO FORMULADO (A), 20% MALTODEXTRINA COM 5% EXTRATO ENZIMÁTICO NO FORMULADO (B), UTILIZANDO AUMENTO DE 1.00 KX E ESCALA DE 50 μ M.	106
FIGURA 4.1. ETAPAS DE PREPARAÇÃO DE MICROESFERAS: 1. SOLUÇÃO DE A-AMILASE (ENZ) EM ALGINATO (ALG) E KEFIRAN (KEF); 2. GOTEJAMENTO DA SOLUÇÃO DE EZ+ALG+KEF) EM CaCl_2 500 MM PARA FORMAÇÃO DAS MICROESFERAS; 3. MICROESFERAS FORMADAS.	116

CAPÍTULO IV

TABELA 4.1. COMPOSIÇÃO DAS MICROESFERAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE A-AMILASE.....	117
FIGURA 4.2. (A) IMAGENS DAS MICROESFERAS DE IMOBILIZAÇÃO E (B) MEDIDA DO DIÂMETRO DAS MICROESFERAS DE IMOBILIZAÇÃO DE A-AMILASE:ALGINATO:KEFIRAN (EZ: ALG:KEF).	121

TABELA 4.2. INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DE MICROESFERAS FORMADAS DE ALG-KEF SOBRE O RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO DE A-AMILASE.....	122
FIGURA 4.3. ESTABILIDADE ENZIMÁTICA PARA AMOSTRAS DE A-AMILASE IMOBILIZADA POR ENVOLVIMENTO COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE POLISSACARÍDEOS (ALGINATO- KEFIRAN), TAMANHO DE PARTÍCULAS, E MODOS DE CONSERVAÇÃO	123
FIGURA 4.4. CICLOS DE REUTILIZAÇÃO DE A-AMILASE IMOBILIZADA EM MATRIZES DE ALGINATO (E-A) E ALGINATO-KEFIRAN (E+A+K, E+A+2K E E+2A+K).....	125
FIGURA 4.5. PERFIL DE TEMPERATURA DE REAÇÃO ENZIMÁTICA COM A-AMILASE LIVRE E IMOBILIZADA EM MICROESFERAS ALGINATO-KEFIRAN	126
FIGURA 4.6. PERFIL DE PH DE REAÇÃO ENZIMÁTICA COM A-AMILASE LIVRE E IMOBILIZADA EM MICROESFERAS ALGINATO-KEFIRAN.....	127
FIGURA 4.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – IMAGENS DAS MICROESFERAS COMPOSTAS POR: ALGINATO-ENZIMA 1000 X (A) 2000 X (B); ALGINATO-KEFIRAN-ENZIMA 1000 X (C) 2000 X (D); ALGINATO-KEFIRAN 1000 X (E) 2000 X (F)	129
FIGURA 4.8. ESPECTRO DE FTIR DE ALGINATO (ALG), KEFIRAN (KEF) E DA MISTURA KEFIRAN-ALGINATO (ALG-KEF) NA RAZÃO DE 1:1.....	131
FIGURA 4.9. ESPECTRO DE FTIR DE ENZIMA (ENZ), ALGINATO-ENZIMA (ALG-ENZ) NA RAZÃO DE 1:1, ALGINATO-KEFIRAN-ENZIMA (ALG-KEF-ENZ) NA RAZÃO DE 1:1:1.....	131
TABELA 4.3. POSIÇÕES DAS BANDAS FTIR (CM ⁻¹) E ATRIBUIÇÕES PARA ALG, KEF, ALG-ENZ (RAZÃO 1: 1), ALG-KEF (RAZÃO 1: 1), ALG-KEF- ENZ) FORMULAÇÕES.....	132
FIGURA 4.10. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) DE AMOSTRAS DE A-AMILASE IMOBILIZADA EM MATRIZES DE ALGINATO (ALG-ENZ), ALGINATO-KEFIRAN (ALG-KEF- ENZ), ENZIMA LIVRE (ENZ TG), ALGINATO-KEFIRAN (ALG-KEF) E ALGINATO (ALG).....	133
TABELA 4.4. EVENTOS TÉRMICOS DA ANÁLISE TGA DE AMOSTRAS DE ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA POR ENVOLVIMENTO EM DIFERENTES MATRIZES.....	134

CAPÍTULO V

TABELA 5.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS COM A ADIÇÃO DAS ENZIMAS	144
--	-----

TABELA 5.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA A-AMILASE LPB DILUÍDA 200X E ENZIMA COMERCIAL SPRING ALPHA 140.000 DILUÍDA 600X	148
TABELA 5.3. RESULTADOS DE FALLING NUMBER FUNGAL PARA ENZIMA LPB E ENZIMA COMERCIAL	149
TABELA 5.4 - RESULTADOS DOS TESTES STANDARD COM CARACTERÍSTICAS DA MASSA DO PÃO PARA APLICAÇÃO DAS ENZIMAS A-AMILASE LPB E SPTING ALPHA 140.000	150
FIGURA 5.1 - GRÁFICO PROFILER – RESULTADOS QUALITATIVOS DO STANDARD PARA AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS A-AMILASES LPB E SPRING ALFA 140.000	151
TABELA 5.5. RESULTADO QUALITATIVO PARA OS PARÂMETROS DE ABSORÇÃO, MISTURA, GLÚTEN, VISCOSIDADE, AMILASE E RETROGRADAÇÃO	153
FIGURA 5.2. GRÁFICO PROFILER, MIXOLAB, CHOPIN+	153
TABELA 5.6. RESULTADOS DE ANÁLISE DE REOFERMENTOGRAFIA.....	154
TABELA 5.7. RESULTADOS DE DESPRENDIMENTO GASOSO NA MASSA	155
FIGURA 5.3. GRÁFICO DE DESENVOLVIMENTO GASOSO PARA APLICAÇÕES DE A-AMILASE PÓ (A-AMILASE LPB E SPRING ALPHA 140.000) COM 30PPM	156
FIGURA 5.4. GRÁFICO DE DESENVOLVIMENTO GASOSO PARA APLICAÇÕES DE A-AMILASE PÓ (A-AMILASE LPB E SPRING ALPHA 140.000) COM 20PPM.	157
TABELA 5.8. RESULTADOS DE APLICAÇÃO DAS ENZIMAS A-AMILASE LPB LÍQUIDA (40 E 80 PPM) E ENZIMA COMERCIAL SPRING ALPHA 140.000 (20 PPM)	159
FIGURA 5.5. PRODUTOS DE APLICAÇÃO DAS ENZIMAS A-AMILASES. AMOSTRA (1) SPRING ALPHA 140.000 (20 PPM) E AMOSTRAS (2) 40 PPM E (3) 80 PPM DA A-AMILASE LPB LÍQUIDA	160
TABELA 5.9. RESULTADOS DE APLICAÇÃO DAS ENZIMAS A-AMILASE LPB PÓ (20 E 30 PPM) E ENZIMA COMERCIAL SPRING ALPHA 140.000 (20 PPM).....	161
FIGURA 5.6. PRODUTOS DE APLICAÇÃO DAS ENZIMAS (AMOSTRA 2 E 4) A-AMILASE LPB PÓ 20 E 30 PPM E ENZIMA COMERCIAL (AMOSTRA 1 E 3) SPRING ALPHA 140.000 (20 E 30 PPM)	162

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α - alfa

β – beta

t - tonelada

kg – quilograma

g – grama

mg - miligrama

mL – mililitro

L – litro

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

M – molar

°C – graus Celsius

® - marca registrada

EC – Enzyme Commission

U – μmol de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática em 1 minuto

U g^{-1} – μmol de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática por minuto em 1 g de matéria seca (atividade enzimática)

U mL^{-1} – μmol de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática por minuto por mL (atividade enzimática)

U mg^{-1} – μmol de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática em 1 minuto por mg de proteína (atividade enzimática específica)

DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

SDS-PAGE – Sodium-dodecil-sulfato – Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
1 AMILASES	24
1.1 α -AMILASES.....	26
1.2 β -AMILASES.....	27
1.3 GLUCOAMILASES	28
2 FONTES DE AMILASES.....	28
3 AMILASES E SUAS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS.....	30
3.1 Amilases na indústria de panificação	33
4 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS.....	35
5 FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE DE ENZIMAS	36
6 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	38
7 REFERÊNCIAS.....	40
CAPÍTULO II. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE AMILASES.....	48
1 INTRODUÇÃO.....	49
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1 SELEÇÃO DE CEPAS PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASES	51
2.1.1 Seleção de microrganismos para a produção de α -amilase.....	51
2.1.2 Seleção qualitativa de cepas produtoras de α -amilase.....	52
2.1.3 Preparo do inóculo para a produção de α -amilase	53

2.1.4 Seleção quantitativa de cepas produtoras de α -amilase	53
2.1.5 Determinação da atividade amilásica	54
2.2 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR <i>ASPERGILLUS oryzae</i> LPB 5593	55
2.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR <i>ASPERGILLUS oryzae</i> LPB 5593 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	55
2.3.1 Influência da concentração de amido como fonte de carbono sobre a produção de α - amilase.....	55
2.3.2 Influência da fonte de nitrogênio sobre a produção de α -amilase	56
2.3.3 Otimizaçãoda composição do meio de cultivo para produção de α -amilase	56
2.3.4 Estudo da cinética de produção de α -amilase em frascos de Erlenmeyer.....	57
2.4 PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM DIFERENTES TIPOS DE BIORREADORES.....	57
2.4.1 Produção de α -amilase por FSm em biorreator do tipo tanque agitado – STR	57
2.4.2 Produção de α -amilase por FSm em biorreator do tipo coluna de bolhas (BCR).....	59
2.5 SEPARAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA α -AMILASE	60
2.5.1 Microfiltração do extrato enzimático em sistema de membranas Pellicon II	60
2.5.2 Ultrafiltração do extrato enzimático em sistema de membranas Pellicon II	60
2.5.2 Determinação da massa molar por SDS-PAGE.....	61
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.1 SELEÇÃO QUALITATIVA DE CEPAS PRODUTORAS DE α -AMILASE	61
3.2 SELEÇÃO QUANTITATIVA DE CEPAS PRODUTORAS DE α -AMILASE POR FSm.....	64
3.3 ETAPAS DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASEPOR <i>ASPERGILLUS</i> <i>oryzae</i> LPB 5593	65
3.3.1 Estudo da influência de diferentes concentrações de amido sobre a atividade de α - amilase.....	65

3.3.2 Influência de diferentes concentrações de fonte de carbono e nitrogênio sobre a atividade de α -amilase	67
FIGURA 2.9. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE MOSTRANDO A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ E AMIDO.....	71
3.3.3 Cinética da produção de α -amilase em frascos de Erlenmeyer.....	72
3.4 PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR FSm EM BIORREATOR DE BANCADA	73
3.4.1 Produção de α -amilase por FSm em biorreator do tipo Tanque Agitado ou Stirred Tank Reactor (STR).....	74
3.4.2 Produção de α -amilase por FSm em biorreator do tipo Coluna de Bolhasou Bubble Columm Reactor (BCR).....	77
3.5 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE α -AMILASE POR MICRO E ULTRAFILTRAÇÃO EM SISTEMA PELLICON II	79
3.6 ELETROFORESE SDS-PAGE	80
4 CONCLUSÕES	81
5 REFERÊNCIAS	83
CAPÍTULO III –ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE FORMULAÇÃO LÍQUIDA E EM PÓ DE α -AMILASE PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	88
1 INTRODUÇÃO.....	89
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	91
2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS DE α -AMILASE PARA ESTUDOS DE FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE	91
2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE α -AMILASE	91
2.3 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO.....	92
2.4 FORMULAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO DE α -AMILASES.....	92

2.4.1 Seleção de componentes para formulação do extrato enzimático de α -amilase	92
2.4.2 Avaliação da interação dos componentes da formulação de amilase.....	94
2.4.3 Estudo da estabilidade comparativo entre extrato amilolítico purificado adicionado ou não de aditivos.....	94
2.5 ESTUDOS DE SECAGEM DA ENZIMA AMILASE POR SPRAY-DRYER.....	95
2.6 ANÁLISE DE PRODUTO FORMULADO DE AMILASE EM PÓ EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	96
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
3.1 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO BRUTO DE AMILASE PRODUZIDO POR FSM POR <i>ASPERGILLUS oryzae</i> LPB 5593.....	96
3.2 FORMULAÇÃO DA ENZIMA AMILASE PRODUZIDA EM FS _m POR <i>ASPERGILLUS oryzae</i> LPB 5593	98
3.2.1 Seleção de componentes para formulação de produto contendo α -amilases	98
3.2.2 Estudo de interação dos aditivos selecionados para formulação da enzima α -amilase.....	99
3.2.3 Teste de estabilidade da formulação da enzima amilase	102
3.3. SECAGEM POR <i>SPRAY-DRYER</i> DO EXTRATO AMILOLÍTICO PARA OBTENÇÃO DE PRODUTO EM PÓ.....	104
3.4 ANÁLISE DE PRODUTO FORMULADO DE AMILASE EM PÓ EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	105
4 CONCLUSÃO	107
5 REFERÊNCIAS.....	108
CAPÍTULO IV IMOBILIZAÇÃO DA α -AMILASE POR ENVOLVIMENTO EM MATRIZES DE ALGINATO DE SÓDIO-KEFIRAN.....	112
1 INTRODUÇÃO.....	113
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	115

2.1. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE α -AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA	115
2.2 EXTRAÇÃO DE KEFIRAN	115
2.3 PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA α -AMILASE EM MICROESFERAS DE ALGINATO-KEFIRAN (ALG-KEF).....	116
2.3.1 Determinação da atividade enzimática	117
2.3.2 Determinação da taxa de imobilização	118
2.3.3. Determinação da estabilidade de α -amilase imobilizada por envolvimento	118
2.3.4 Ciclos de re-utilização da α -amilase imobilizada.....	118
2.4. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH ÓTIMOS DA α -AMILASE LIVRE E IMOBILIZADA	119
2.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE ESFERAS COM α -AMILASE IMOBILIZADA	119
2.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO TRANSFORMADA POR FOURIER (FTIR)	119
2.7 ESTABILIDADE TÉRMICA POR ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS (TG/DTG)	120
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
3.1 IMOBILIZAÇÃO DA α -AMILASE POR ENVOLVIMENTO EM MICROESFERAS DE ALGINATO-KEFIRAN (ALG-KEF).....	120
3.1.1. Determinação da taxa de imobilização.....	121
3.1.2 Determinação da estabilidade de α -amilase imobilizada	123
3.1.3. Determinação dos ciclos de re-utilização da α -amilase imobilizada	124
3.1.4. Determinação da temperatura e do pH ótimos da α -amilase livre e imobilizada.....	125
3.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE MICROESFERAS DE α -AMILASE IMOBILIZADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	128

3.3 ANÁLISE DE MICROESFERAS DE α -AMILASE IMOBILIZADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO TRANSFORMADA POR FOURIER (FTIR) ..	130
3.4 ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS DE MICROESFERAS DE α -AMILASE IMOBILIZADA	133
4 CONCLUSÃO	135
5 REFERÊNCIAS	136
CAPÍTULO V. ESTUDOS DE APLICAÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE NA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO.....	141
1 INTRODUÇÃO.....	142
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	143
2.1 PRODUÇÃO DE α -AMILASE PARA OS ESTUDOS DE APLICAÇÃO	143
2.2 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DA α -AMILASE	143
2.3 ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA α -AMILASE LÍQUIDA NA PRODUÇÃO DE PÃES	144
2.4. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS ENZIMAS LPB E COMERCIALEM PÓ NA PRODUÇÃO DE PÃES.....	144
2.4.1. Falling Number Fungal.....	145
2.4.2. Mixolab.....	145
2.4.3. Reofermentografia	146
2.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO DA α -AMILASE PRODUZIDA EM FSM POR <i>ASPERGILLUS oryzae</i> LPB 5593 NO PROCESSO DE PANIFICAÇÃO.	147
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	147
3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	147
3.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS ENZIMAS POR APLICAÇÃO EM EQUIPAMENTOS.....	148

3.2.1. <i>Falling Number Fungal</i>	148
3.2.2. Mixolab	150
3.2.3. Reofermentografia	154
3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO DA α -AMILASE PRODUZIDA EM FSM POR <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i> LPB 5593 NO PROCESSO DE PANIFICAÇÃO	158
3.3.1 Aplicação da enzima α -amilase LPB líquida	158
3.3.2 Aplicação da enzima α -amilase LPB em pó	160
4 CONCLUSÕES	162
5 REFERÊNCIAS	163
REFERÊNCIAS GERAIS	165

1 INTRODUÇÃO

A globalização e o crescimento constante do mercado de enzimas evidencia a necessidade de busca por produtos biotecnológicos, transformando o desenvolvimento de preparações enzimáticas num campo de extensa investigação na área da biotecnologia. Tendências globais e previsões definem o segmento do mercado de enzimas com uma análise do seu valor global. O mercado está segmentado e a previsão deste valor é feita com base nas grandes regiões, tais como América do Norte, Europa, Ásia e restante do mundo (MARKETS AND MARKETS, 2014).

De acordo com estudo realizado por Freedonia Group Inc, a demanda global por enzimas subirá 6,3% atingindo U\$ 7 bilhões em 2017 (CHEMICAL WEEKLY, 2014). A demanda mundial de enzima está distribuída em 12 grandes produtores e 400 fornecedores de menor porte. Quase 75% da totalidade das enzimas são produzidas por três empresas, DuPont, Novozymes com sede nos EUA e Roch com sede na Suíça.

Entre as diferentes classes de enzimas, as amilases pertencem ao grupo das hidrolases e são mundialmente conhecidas representando a maior parte do mercado mundial de enzimas. São derivadas de várias fontes tais como plantas, animais e microrganismos (PANDEY et al., 2005; OMEMU et al., 2005; BOZICK et al., 2011; MAITY et al., 2011), são comercialmente importantes, representando cerca de 25-33% do mercado mundial de enzimas (KUMARA et al., 2012; AMOOZEGAR et al., 2013). Dentre as principais fontes microbianas produtoras de amilases estão os fungos, as leveduras e as bactérias (ILLANES, 2008; COPELAND, 2000).

A α -amilase é uma endoenzima que hidrolisa as ligações α -1,4 da amilose, amilopectina, amido e glicogênio e libera glicose e oligossacarídeos de 6-7 unidades de glicose e, posteriormente, açúcares redutores (principalmente maltose). Esta endoenzima hidrolisa a molécula de amido, provocando uma rápida diminuição da viscosidade quando em solução, perda da capacidade de coloração por iodo e aumento do poder redutor, devido à produção de grupos redutores. A diminuição da viscosidade é proporcionalmente maior quanto maior o aumento de grupos redutores, já que a α -amilase ataca as ligações internas. São também chamadas de

enzimas dextrinizantes e podem ser divididas em duas categorias de acordo com o grau de hidrólise do substrato: α -amilases liqueficientes, que quebram de 30 a 40% do substrato e as α -amilases sacarificantes que hidrolisam de 50 a 60% do substrato (DECLERCK et al., 2000).

Aplicações de amilases são relatadas para uma série de processos industriais tais como panificação, fabricação de cerveja, processamento de amido, farmacêutica, têxtil, detergentes e indústrias de papel (KAMMOUN et al., 2008; AIYER, 2005; LIN et al., 1997; PANDEY et al., 2000). O seu emprego é direcionado especificamente para hidrólise do amido para a geração de glicose, maltose, e uma mistura de malto-oligossacarídeos (YANG et al., 2004, KUMAGAI, et al., 2013), sendo um processo consolidado. Atualmente, amilases também estão sendo direcionadas para a gestão de meio ambiente através de tratamento de águas residuais de processamento de amido (JIN et al., 1999; AIYER, 2005). Na indústria de panificação as amilases são empregadas para aumentar o tempo de armazenamento dos produtos (MAEDA et al., 2003).

Com o propósito de contribuir para a viabilização da produção de alfa-amilases no Brasil, a pesquisa aqui apresentada buscou desenvolver um processo acerca da obtenção desta enzima por fermentação submersa (FSm). A otimização das etapas de produção da alfa-amilase, em particular, separação, purificação e formulação foram desenvolvidas. O processo visou igualmente sua aplicação comercial. Testes de estabilidade, com o uso de diferentes aditivos para compor a formulação da α -amilase produzida, líquida e em pó, foram realizados visando obter um bioproduto para aplicação especificamente em panificação, a fim de obter um produto brasileiro de baixo custo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um bioprocesso para a produção de amilases por fermentação submersa (FSm) e realizar sua separação, purificação, formulação e aplicação em panificação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar microrganismo(s) produtores de amilases;
- Otimizar as condições físico-químicas e composição do meio para produção de amilases;
- Caracterizar a(s) enzima(s) produzida(s);
- Separar e purificar a(s) amilase (s) produzidas;
- Estudar formulações de amilase(s) produzida(s) de modo a se obter um produto enzimático estável;
- Avaliar a estabilidade da(s) amilase(s) em diferentes condições de armazenamento;
- Testar o potencial de aplicação do produto enzimático obtido na indústria de panificação.

CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 AMILASES

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores altamente específicos em reações bioquímicas. Como outros catalisadores eles aumentam a taxa de uma reação química sem ser consumidos pela reação. São proteínas compostas de aminoácidos e são encontradas em todos os organismos vivos.

As amilases são enzimas que catalisam reações bioquímicas, estão amplamente presentes em microrganismos, plantas e animais, e têm encontrado aplicações em diversas indústrias, (TAVANO, FERNANDEZ-LAFUENTE, GOULART & MONTI, 2013). Desde os primeiros relatos sobre amilases bacterianas industriais, na década de 1920, um grande número de α -amilases microbianas de diferentes origens têm sido amplamente estudado e aplicado em um vasto espectro de indústrias que vão desde alimentos para as indústrias têxtil, de detergentes, biocombustíveis e papel. Além disso, inovadoras aplicações clínicas foram realizadas na medicina e na eliminação de poluentes ambientais (MOBINI-DEHKORDI, 2012; QUAX, 2006).

As amilases são enzimas versáteis com uma longa história de aplicações catalíticas em indústrias alimentares, principalmente para a liquefação de amido para sacarificação, e indústria farmacêutica (SEN et al., 2016). Esse grupo de enzimas é importante principalmente na produção de xaropes de milho pela sua capacidade de romper as ligações glicosídicas do amido. As amilases são classificadas de maneira geral em duas categorias, exoamilases e endoamilases, em função do tipo de reação catalisadas. As endoamilases são capazes de clivar ligações α , 1-4 glicosídicas presentes na parte interna (endo-) da cadeia de amilose ou amilopectina em proporções que variam entre os amidos procedentes de diferentes espécies vegetais, e mesmo entre amidos provenientes da mesma espécie. As proporções de amilose e amilopectina variam de acordo com o grau de maturação das plantas e influem na viscosidade e no poder de retrogradação do amido (POMERANZ, 1988). A α -amilase (EC.3.2.1.1), uma das endoamilases industriais mais importantes (GUPTA, 2003), é produzida por muitas espécies,

incluindo animais, plantas e microrganismos. Destas, as α -amilases dos microrganismos são preferidas devido à sua plasticidade para manipulação genética e potencial para produção em massa mais econômica (RANA et al., 2014). Os produtos finais da ação da α -amilase são oligossacarídeos com comprimento variável com uma α -configuração e α -limite dextrinas, que constituem oligossacarídeos ramificados.

As exoamilases clivam exclusivamente ligações α , 1-4 glicosídicas, tais como as β -amilases (EC 3.2.1.2), e ligações α 1-4 e α 1-6 glicosídicas tais como as amiloglicosidases ou glucoamilases (EC 3.2.1.3) e α -glucosidases (EC 3.2.1.20). As exoamilases atuam sobre os resíduos de glucose externos da amilose ou amilopectina e assim produzem apenas glucose (glucoamilase e α -glucosidase), ou maltose e dextrina β -limite (β -amilase). A β -amilase e a glucoamilase também convertem a configuração anomérica da maltose libertada de α para β . A glucoamilase e α -glucosidase diferem na sua preferência em relação ao substrato: α -glucosidase atua melhor em malto-oligossacarídeos curtos e libera glucose com uma configuração α , enquanto a glucoamilase preferencialmente hidrolisa polissacarídeos de cadeia longa (PANDEY et al., 2000; MITIDIERI et al., 2006). A ação das amilases sobre a cadeia do amido pode ser observada na FIGURA 1.1.

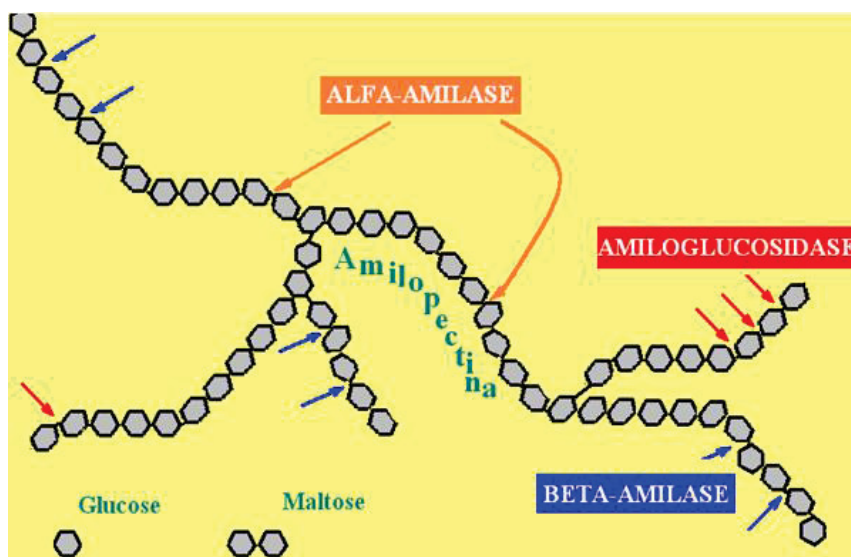


FIGURA 1.1—AÇÃO DAS AMILASES SOBRE A CADEIA DO AMIDO

A amilose é uma molécula essencialmente linear, com os átomos em arranjo helicoidal, pois as ligações glicosídicas entre suas unidades de glucose são em sua maior parte do tipo α -1,4, e há um pequeno grau de ramificação. Já a amilopectina apresenta uma molécula ramificada, com ligações glicosídicas do tipo α -1,4 e do tipo α -1,6, sendo essa última, responsável pela ramificação (CAUVAIN, 2003; SINGH et al., 2010). Uma molécula de amilose contém cerca de 200 a 2000 subunidades de glucose com estrutura de hélice simples. A molécula de amilopectina é muito maior, com cerca de 6000 a 100000 subunidades de glucose, caracterizada por frequente ramificação no átomo C6 (POPPER, SHÄFER, FREUND, 2006).

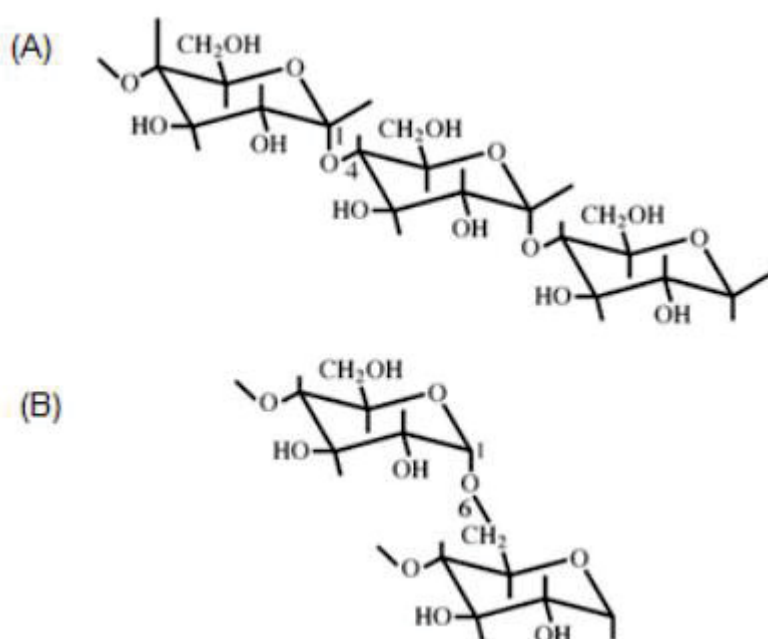


FIGURA1.2 - (A) ESTRUTURA PARCIAL DA AMIOLOSE E (B) ESTRUTURA PARCIAL DA AMILOPECTINA FORMANDO LIGAÇÕES α -1,6 NAS RAMIFICAÇÕES. FONTE: CAUVAIN (2003).

1.1 α -AMILASES

A história das amilases iniciou em 1811 quando a primeira enzima de degradação do amido foi descoberta por Kirchhoff (GUPTA et al., 2003). Esta enzima é uma hidrolase, que pode converter o amido em açúcares redutores, xaropes e dextrina. É um importante biocatalisador empregado na indústria de

alimentos (WU et al., 2013). Estas enzimas têm sido utilizadas como enzimas industriais e constituem aproximadamente 25 a 30% das enzimas produzidas globalmente (SAUER et al., 2000; CHAKRABORTY et al., 2011).

As α -amilases (EC.3.2.1.1.) são enzimas que catalisam a clivagem específica de ligações α -(1,4) glicosídicas de moléculas de amilose e amilopectina de polissacárideos, por exemplo, amido e glicogênio (KOYAMA et al., 2001). As α -amilases são enzimas com maior participação no mercado global, podendo ser aplicadas em sua maioria na sacarificação do amido, na produção de bioetanol, na indústria têxtil, na indústria de detergentes, além de outras aplicações (SHARMA E SATYANARAYANA, 2013, VAN DER MAAREL et al., 2002; CHI et al., 2009). Os oligossacárideos produzidos, como a maltose, são então hidrolisados por α -glucosidases (amiloglucosidases) liberando glicose (KOLAWOLE E SIRDESHMUKH, 2011).

Conforme Yadav (2012), para que enzimas possam ser aplicadas, a estabilidade estrutural é um dos aspectos mais importantes e que definem o seu uso. O mesmo autor citou que a estabilidade estrutural das α -amilases depende de vários fatores intrínsecos, tais como sua sequência de aminoácidos, e extrínsecos tais como pH.

As condições ótimas de aplicação de α -amilases comerciais são temperaturas de 90-95°C (enzimas termoestáveis), com pH ácido a neutro, de 6,0 - 6,5 (GOYAL et al., 2005). A maioria das α -amilases são instáveis a pH baixo (GANGADHARAN et al., 2009). No entanto, a aplicação de amilases encontra dois problemas: alto consumo de energia devido às altas temperaturas do processo levando a altos custos e necessidade de controle do pH de modo a favorecer a atividade enzimática.

1.2 β -AMILASES

A β -amilase (EC 3.2.1.2) é uma exo-enzima que catalisa a clivagem de ligações β -1,4-glucosídicas de polissacáridos e libera maltose a partir da extremidade não redutora (HENRISSAT E DAVIES, 1997; DABA, KOJIMA e INOUE, 2013; WORTHINGTON, 2013).

As β -amilases removem sucessivamente unidades maltose da extremidade não redutora da cadeia polissacarídica, produzindo a β -maltose e a dextrina β -limite como produtos finais (FAZEKAS et al., 2013). No entanto, existem algumas diferenças entre as β -amilases bacterianas e vegetais em relação à sua capacidade de se ligar e hidrolisar amido cru (OYAMA et al., 2003; BWANGANGA e BÉRA, 2013). A β -amilase desempenha um papel muito importante no metabolismo do amido dos cereais em desenvolvimento, bem como na germinação (KOLAWOLE et al., 2011).

1.3 GLUCOAMILASES

Glucoamilases (1,4- α -D-glucano gluco-hidrolases), EC 3.2.1.3, são enzimas que hidrolisam ligações α -1,4 sucessivas na extremidade não redutora de moléculas de amido, liberando glicose livre (MARÍN-NAVARRO e POLAINA, 2011). Do ponto de vista estrutural, essas enzimas constituem a maior parte da família GH15 de hidrolases glicosídicas (CANTAREL et al., 2009; MARÍN-NAVARRO e POLAINA, 2011).

Com base em estudos anteriores, Satoh, Inouyee Ojima, (2013) relataram que as α -glucosidases estão envolvidas na degradação do amido em conjunto com α -amilases. As glucoamilases têm sido utilizadas para diversas aplicações farmacêuticas e industriais, tais como a produção de alimentos, papel, têxteis, detergentes e açúcares, desempenham um papel vital no campo da pesquisa enzimática (ZHANG et al., 2012).

2 FONTES DE AMILASES

As fontes de amilases podem ser as mais diversas possíveis: actinomicetos, vegetais, bactérias, fungos e leveduras. As enzimas microbianas são hoje as mais produzidas sendo as fúngicas as mais estudadas e implementadas em nível industrial (GUPTA et al., 2003).

Sharma e Satyanarayana (2013) citam exemplos de microrganismos que produzem α -amilase. São principalmente: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Trichoderma longibrachiatum*, e outros (LI et al., 2012). *Aspergillus oryzae* tem recebido maior atenção como hospedeiro favorável para a produção de proteínas heterólogas devido à sua capacidade de segregar uma grande quantidade de proteínas de elevado valor e enzimas industriais (DJEKRIF-DAKHMOUCHE et al., 2006) e tem sido amplamente utilizado na produção de alimentos como molho de soja, ácidos orgânicos, tais como ácidos cítrico e acético e enzimas comerciais, incluindo α -amilase (KAMMOUN et al., 2008). Nas Tabelas 1.1 e 1.2 são apresentados os microrganismos produtores de α -amilases.

Dentre as bactérias (Tabela 1.1), as espécies de *Bacillus* são consideradas as fontes mais importantes de α -amilase e têm sido utilizadas para a produção de enzimas (HOMAEI et al., 2015).

TABELA 1.1 - PRODUÇÃO DE α -AMILASES POR DIFERENTES GÊNEROS DE BACTÉRIAS

Espécie	Tipo de fermentação	Atividade enzimática	Referência
<i>Bacillus</i> spp	FSm	35,97 U.mL ⁻¹	Barus et al., 2013
<i>Bacillus</i> spp	FSm	538 U.mL ⁻¹	Ravindar et al., 2013
<i>Alicyclobacillus</i> sp	FSm	2,3 U.mL ⁻¹	Bai et al., 2012
<i>Bacillus subtilis</i> JS-2004	FSm	72 U.mL ⁻¹	Asgher et al., 2007
<i>Bacillus subtilis</i> AS-S01a	FSm	500 U.mL ⁻¹	Roy et al., 2012
<i>Bacillus subtilis</i>	FSm	336 U.mL ⁻¹	Konsoula et al., 2006
<i>Bacillus acidicola</i> TSAS1	FSm	10,100 IUI ⁻¹	Sharma and Satyanarayana., 2011
<i>Bacillus</i> sp. KR-8104	FSm	3824 U.L ⁻¹	Hashemi et al., 2013
<i>Bacillus</i> sp. KR-8104	FSm	662 U.mL ⁻¹	Hashemi et al., 2013
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	FSm	663 U.mL ⁻¹	Tanyildizi et al., 2007
<i>Bacillus licheniformis</i> AS08EB	FSm	172 U.mL ⁻¹	Roy et al., 2013

Do grupo dos fungos, os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Lipomyces*, *Thermomyces* e *Trichoderma* foram citados. Fungos produtores de α -amilase são apresentados na Tabela 1.2.

TABELA 1.2 - PRODUÇÃO DE α -AMILASES POR DIFERENTES GÊNEROS FUNGOS

Espécie	Tipo de fermentação	Atividade enzimática	Referência
<i>Aspergillus awamori</i> IOC-3914	FES	22,8 U.mL ⁻¹	López et al., 2013
<i>Fusarium solani</i> (NFCCP)	SSF	665 U/mg ⁻¹	Bhatti et al., 2007
<i>Aspergillus penicillioides</i> TISTR3639	FSm	118,42 U/mg ⁻¹	Ali et al., 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	FSm	5220 U.mL ⁻¹	Ghobadi et al., 2017
<i>Aspergillus kawachii</i> NBRC4308	FSm	150,8 U.mL ⁻¹	Shoji et al., 2007
<i>Aspergillus niger strain</i> UO-1	FSm	70,29 U.mL ⁻¹	Hernández et al., 2005
<i>Aspergillus oryzae</i> S.	FES	731.53 U/g	Chancharoonpong et al., 2012
<i>Aspergillus oryzae</i> Strain S2	FSm	350 U.mL ⁻¹	Sahnoun et al., 2012
<i>Aspergillus oryzae</i> IFO-30103	FSm	627,5 U.mL ⁻¹	Dey et al., 2015
<i>Aspergillus uracil</i>	FSm	958 U.mL ⁻¹	Mao et al., 2015
<i>Aspergillus niger</i> L119	FSm	3,9 U.mL ⁻¹	Mitidieri et al., 2005

3 AMILASES E SUAS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

As amilases estão entre as enzimas de grande importância para a biotecnologia, constituindo uma classe de enzimas industriais com aproximadamente 25% do mercado mundial de enzimas (REDDY et al., 2003; RAJAGOPALAN et al., 2008). Todas as classes de enzimas têm uma aplicação dentro da área de alimentos, mas as hidrolases são possivelmente a classe predominante.

Aplicações das amilases no processamento industrial são apresentados na Tabela 1.3. A utilização generalizada de amilases no processamento de alimentos é facilmente compreensível, dada a sua especificidade insuperável, capacidade de operar sob condições suaves de pH, temperatura e pressão (FERNANDES, 2010).

As amilases catalisam a hidrólise de ligações glucosídicas em polímeros de amido, comumente encontrados em alimentos como massas, frutas, chocolate, alimentos para crianças, molho de churrasco (HMIDET et al., 2009).

TABELA 1.3 - ÁREAS DE APLICAÇÕES DE AMILASES

Campos de aplicação		Enzima	Benefícios Técnicos
Aplicações Técnicas	Indústria de celulose e papel	Amilase	Clivando moléculas de amido para reduzir a viscosidade para colagem superficial em revestimento, mas não utilizado para aditivo de agente de resistência a seco
	Indústria textil	Amilases	Desengorduramento eficientemente sem efeitos nocivos sobre o tecido
	Detergentes para roupas	Amilases	Remove os resíduos de amido resistente
Processamento de alimentos	Indústria de Panificação	α -amilase	Degradação do amido em farinhas, controle do volume e estrutura do miolo em pães
	Indústria de sucos	Amilases, glucoamilases	Quebra o amido em glicose Clareamento de sucos, especialmente sucos de maçã
	Processamento de amido	α -amilase	Clivam as ligações glicosídicas α -1,4 na região interior do amido Causa uma diminuição rápida no peso molecular e na viscosidade do substrato
	Indústrias de bebidas	α -amilase	Hidrolizar o amido e reduzir viscosidade Liquefação de amido de cereais Aumento no conteúdo de maltose e glicose
	Indústria de alimentação animal	α -amilase	Digestão do amido

FONTES : BLOOM et al., 2005; CLOUTHIER et al., 2012; FERNANDES, 2010; RIBEIRO et al., 2010; BINOD et al., 2008; KIRK et al., 2002; SCHAFER et al., 2006; TRAMICE et al., 2007.

Embora os resíduos agro-industriais sejam ricos em carboidratos, sua utilização é limitada (PANDEY et al., 2001). O amido é a segunda fonte de carbono e energia mais importante entre os carboidratos, precedido pela celulose em biossíntese (BUCHHOLZ e SEIBEL, 2008). É utilizado principalmente nas indústrias de alimentos, têxteis, papel e produção de álcool, entre outros usos (SHARMA e SATYANARAYANA, 2012). A maioria dos processos industriais usa enzimas para hidratar o amido normalmente em um processo de dois passos: liquefação e sacarificação (HOBBS, 2009). O mecanismo de ação das enzimas no amido é amplamente conhecido e as enzimas são classificadas de acordo com este mecanismo (ROBYT, 2009). A α -amilase substituiu quase completamente a hidrólise química do amido na indústria de processamento de amido (PANDEY et al., 2000). A produção de xaropes com alta concentração de glicose representa um processo enzimático amplamente utilizado na indústria alimentar que se refletiu num grande interesse para investigar a cinética da hidrólise de amido ou maltodextrina pelas enzimas nas últimas décadas (CEPEDA et al., 2001).

As amilases são largamente utilizadas na indústria têxtil para o processo de desengate (SOUZA et al., 2010). Foi descrita a utilização de α -amilases no dimensionamento de fibras têxteis com grande resistência (HENDRIKSEN et al.,

1999). As α -amilases reduzem seletivamente o tamanho e não atacam as fibras de matérias textéis (AHLAWAT et al., 2009; FEITKENHAUER, 2003; GUPTA et al., 2003).

A utilização de α -amilase produz amidos modificados para a indústria de papel (PANDEY et al., 2000) e modificação de amido de papel revestido (GUPTA et al., 2003; VAN DER MAAREL et al., 2002). O tratamento de revestimento serve para tornar a superfície do papel suficientemente lisa e forte, para melhorar a qualidade de escrita do papel (SOUZA et al., 2010).

As amilases são o segundo tipo de enzimas utilizadas na formulação de detergentes enzimáticos (HMIDET et al., 2009; GUPTA et al., 2003; MITIDIERI et al., 2006). As α -amilases alcalinas são utilizadas em detergentes para degradar os resíduos de alimentos amiláceos tais como batatas, molhos, creme, chocolate e outros (SOUZA et al., 2010). As amilases utilizadas na indústria de detergentes são derivadas de *Bacillus* ou *Aspergillus* (MITIDIERI et al., 2006). Uma das limitações das α -amilases nos detergentes é que a enzima mostra sensibilidade ao cálcio e a estabilidade é gravemente comprometida num ambiente com baixo teor de cálcio (GUPTA et al., 2003).

Para a produção de etanol, o amido é um substrato bastante utilizado devido ao seu baixo preço e à sua fácil utilização na maior parte das regiões do mundo (CHI et al., 2009). Para essa finalidade, o amido deve ser hidrolisado, sendo submetido a dois passos enzimáticos para a obtenção de açúcares fermentáveis. A bioconversão de amido em etanol envolve a liquefação e sacarificação, onde o amido é convertido em açúcar utilizando um microrganismo amilolítico ou enzimas tais como α -amilase, seguido de fermentação, em que o açúcar é convertido em etanol utilizando um microrganismo fermentador de etanol como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (MORAES et al., 1999, ÖNER, 2006).

Com o desenvolvimento da biotecnologia, a aplicação de amilases ocorre em muitos outros campos, tais como a química clínica, medicinal e analítica (GUPTA et al., 2003). Existem vários processos nas áreas médicas, que envolvem a aplicação de amilase. A aplicação de um reagente estável líquido, com base na α -amilase para o sistema de química clínica Ciba Corning Express, foi descrita (BECKS et al.,

1995). Foi também desenvolvido um processo para a detecção de oligossacarídeos superiores, que envolveu a aplicação de amilase (GIRI et al., 1990).

3.1 Amilases na indústria de panificação

As mudanças no setor de panificação e a demanda cada vez maior por produtos naturais fizeram com que as enzimas ganhassem uma grande importância na formulação de produtos de panificação. Na panificação enzimas são utilizadas como componentes de melhoradores ou condicionadores de massas.

A indústria de panificação é um grande consumidor de amido e enzimas modificadoras de amido (MARC et al., 2002). As enzimas mais utilizadas em panificação são as amilases, porém, recentemente, vêm sendo introduzidas novas enzimas na tecnologia de panificação, dentre as quais pode-se destacar as hemicelulases, incluindo as xilanases, as glicose-oxidases, as lipases e as proteases (AMMAR et al., 2002; PARIZA, JOHNSON, 2001; COURTIN, DELCOUR, 2002; QUEJI et al., 2006).

Cada uma das enzimas tem o seu próprio substrato específico na massa feita de farinha de trigo. Como a interação desses substratos na massa e no pão é bastante complexa, a utilização de combinações de enzimas deve ser criteriosa. Muitas vezes, uma dosagem excessiva de uma enzima pode ter efeito prejudicial sobre a massa ou o pão. Por exemplo, um excesso de α -amilase fúngica ou hemicelulase/xilanase pode resultar em uma massa demasiadamente grudenta para ser manuseada pelo padeiro ou a masseira. Assim, seria benéfico para certos tipos de formulações usar uma combinação de enzimas com menor dosagem de α -amilases e xilanase e menor dosagem de lipases ou glicose oxidases para conseguir uma massa de consistência ótima e estável ou usar α -amilase maltogênica em combinação com α -amilase fúngica e xilanase ou lipase para assegurar um miolo macio num pão de ótima qualidade em termos de estrutura de miolo, volume, e outras características.

Amilases normalmente empregadas em panificação têm diferentes funções e efeitos. As α -amilases são usadas principalmente na indústria de panificação para

melhorar seu sabor, textura, digestibilidade e valor nutricional (SOUZA et al., 2010; SHUANG et al., 2012). As α -amilases ajudam a ajustar a farinha padronizando suas características reológicas. A sua aplicação assegura boa aparência, volume, cor e estrutura do miolo desejados (FIGURA 1.3). Na panificação, é necessária uma forte rede de glúten para reter os gases formados durante o processo de fermentação e desenvolvimento da massa, assim como produzir volume e suportar salto de forno (desenvolvimento do pão durante o cozimento), bem como resistência mecânica durante o manuseio da massa. As α -amilases podem ser adicionadas à massa para degradar o amido danificado na farinha em dextrinas menores, que são subsequentemente fermentadas pela levedura. A adição de α -amilase à massa resulta no aumento da taxa de fermentação e na redução da viscosidade da massa, resultando em melhorias no volume e na textura do produto (SOUZA et al., 2010). Além disso, os pequenos oligossacarídeos e açúcares como a glicose e maltose, liberados pela ação destas enzimas, aumentam as reações de Maillard, responsáveis pelo dourado da crosta e pelo aroma do pão quente.



FIGURA 1.3 – EFEITOS DA APLICAÇÃO DA AMILASE NA PRODUÇÃO DE PÃES

Outro aspecto importante do uso das amilases em panificação é o efeito de anti-estratificação, conhecido como “Stalling”, envelhecimento do pão, melhorando a retenção da maciez dos produtos cozidos, aumentando a validade do produto (GRUPTA et al., 2003). Além disso, gera açúcar adicional na massa, o que melhora o sabor e a cor da casca (VAN DER MAAREL et al., 2002). Essa é uma das aplicações da α -amilase maltogênica na indústria, a qual promove o atraso do envelhecimento de produtos cozidos. O primeiro efeito é o aumento de volume,

reduzindo a firmeza do miolo após o cozimento e durante o armazenamento. Amilases termoestáveis são mais eficientes, as quais resistem ao cozimento e são provavelmente ativas durante o arrefecimento do pão e durante o armazenamento (BINOD et al., 2013). No entanto, as amilases com alta termoestabilidade requerem uma dosagem ótima. O uso sinérgico de α - e β -amilase também é sugerido para aumentar a vida útil de produtos assados (VAN EIJK, 1991). A adição de α -amilase não só tem um efeito anti-staling substancial, mas também melhora a elasticidade do miolo do pão, sendo necessária na panificação, já que a atividade de α -amilase é normalmente muito baixa no trigo (BOWLES, 1996; CAUVAIN e CHAMVERLAIN, 1988; KULP e PONTE, 1981; MARTÍNEZ-ANAYA e JIMÉNEZ, 1997; RANUM e DE STEFANIS, 1990; SI, 1997).

TABELA 1.4 - ENZIMAS UTILIZADAS EM PANIFICAÇÃO.

Nome da Enzima Amilase	Fonte (empresa)	Atividade Enzimática	Apresentação do Produto
Spring alfa 140000	Granotec	140000 SKB/g	Pó
Spring Alfa 100000	Granotec	100000 SKB/g	Pó
Spring Alfa 40000	Granotec	40000 SKB/g	Pó
Spring Plus	Granotec	6000 UAMG/g	Pó
Alfa amilase maltogênica	AB Enzymes	462 Azg-1	Pó
Alfa amilase maltogênica + fúngica	AB Enzymes	154 Azg-1	Pó
Alfa amilase fúngica	AB Enzymes	1728 Azg-1	Pó

4 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

O processo de purificação destina-se à remoção de impurezas bem como à concentração do produto. A obtenção de enzimas purificadas inclui entre outros objetivos a caracterização e identificação destas, bem como a sua produção para uso comercial (ZUÑIGA et al., 2003; DAKO et al., 2012).

Em FSm onde as enzimas já se encontram no meio de fermentação líquido, os procedimentos para purificação/concentração mais utilizados são: filtração convencional, onde a suspensão é submetida ou não a ação de pressão através de um meio filtrante, permeando todo o fluxo de solvente. Ocorre a formação de uma torta de filtração pela deposição das partículas (KILIKIAN; PESSOA JR., 2001); filtração tangencial, onde ocorre o escoamento do meio filtrante, eliminando parte do fluxo que alimenta a membrana em uma corrente denominada retido. Nesses processos a tensão de cisalhamento do fluido minimiza o acúmulo de partículas na superfície das membranas, diminuindo a formação da torta (KILIKIAN; PESSOA JR., 2001; SEADER et al., 2010). Os processos de separação e purificação de enzimas também são classificados quanto ao tipo de membrana, sendo as membranas densas ou não porosas as quais são empregadas em Osmose Reversa e Nanofiltração, e as membranas porosas, as quais são utilizadas em Microfiltração e Ultrafiltração.

As membranas porosas separam as partículas por tamanho e as membranas densas por diferença dos coeficientes de solubilidade e difusão entre o solvente e o soluto. Entre os diferentes métodos de purificação empregados atualmente para enzimas como por exemplo para α -amilase, a microfiltração e ultrafiltração tem recebido industrialmente atenção especial.

5 FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE DE ENZIMAS

Atualmente, as amilases encontram aplicação potencial em uma série de processos industriais como a fabricação de pão, a fabricação de cerveja, o processamento de amido, indústria farmacêutica, têxtil, detergentes e papel. A otimização da produção de α -amilases, em particular a separação, purificação e formulação, é de primordial importância devido ao seu impacto na economia e viabilidade do processo. As enzimas são particularmente sensíveis às variações do ambiente, podendo rapidamente perder a sua atividade, muitas vezes de forma irreversível. Dentre todas as condições adversas praticadas na indústria, as altas temperaturas são o fator mais limitante de atuação enzimática. Algumas teorias sustentam que a termo estabilidade das enzimas está associada ao fato de que

estas interagem com outros componentes celulares, como lipídeos e polissacarídeos, formando uma matriz que protege a enzima da desnaturação.

Acredita-se que as enzimas de origem termófila possuem características particulares no que se refere à sua estrutura, interação e forma compacta quando comparadas a enzimas de mesma ação, porém de origem mesofílica (MOZHAEV e MARTINEK, 1984). Algumas características genéticas podem estar associadas aos micro-organismos termófilos, as quais resultam em estruturas diferenciadas mais resistentes (VETRIANI et al., 1998). Desta forma, alguns métodos podem ser empregados na tentativa de preservar a estrutura tridimensional das enzimas ou simular seus ambientes de origem. Dentre os métodos podem ser citados: a imobilização de enzimas em matrizes sintéticas ou naturais, modificações químicas das moléculas (COSTA et al., 2002; GULLA et al., 2004), modificações genéticas e associação com aditivos em uma formulação (FU et al., 2010). Os aditivos são compostos adicionados ao produto de interesse, como sais, aminoácidos, surfactantes, metil ésteres, compostos metálicos, polihídricos, polieletrólitos, antibióticos (BOURNEOW et al., 2012), polissacarídeos (LI et al., 2010), entre outros.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na RESOLUÇÃO Nº 54, DE 07 DE OUTUBRO DE 2014 estabelece como preparação enzimática formulação constituída por uma ou mais enzimas, com a incorporação de ingredientes ou aditivos alimentares, a fim de facilitar o seu armazenamento, comercialização, padronização, diluição ou dissolução. As RDCs (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 53 e nº 54 normatizam as preparações enzimáticas. Na RDC nº 54 é mostrada a normatização técnica para uso de enzimas na produção de alimentos em geral. A RDC nº 53, DE 07 DE OUTUBRO DE 2014 dispõe em seus anexos I, II e III da relação de enzimas com suas respectivas fontes de obtenção, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso como coadjuvante de tecnologia na produção de alimentos em geral.

Existe uma grande preocupação quanto à estabilidade das enzimas, uma vez que o produto deve resistir às condições de armazenamento e transporte, com a máxima manutenção da atividade. Aditivos e processos são usados para aumentar o tempo de armazenamento da enzima, tendo cada um as suas vantagens e

desvantagens, sendo mais comuns: albumina, aminoácidos, açúcares, agentes quelantes, alcoóis hidrofílicos, polietilenoglicol, sais e surfactantes. No entanto, geralmente mais de um excipiente é necessário na formulação para proporcionar os atributos desejáveis (BANGA, 2006; ILLANES, 2008).

A ANVISA, por meio de suas resoluções, estabelecem padrões e critérios no uso de aditivos na produção de preparações enzimáticas, porém ainda não existem normas técnicas que regulamentem estudos de estabilidade como na indústria farmacêutica.

6 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

As enzimas podem ser usadas em ação sinérgica na indústria para aumentar o rendimento do produto desejado. Este processo é mais econômico para processos industriais de várias etapas, para reduzir custos e tempo (MINAKSHI e PUNDIR, 2008). A utilização de enzimas imobilizadas oferece várias vantagens sobre as enzimas livres, tais como a relativa facilidade de separação do produto, a reutilização de biocatalisadores, a prevenção da lavagem, o reduzido risco de contaminação e a estabilidade operacional. Além disso, pode ser estabelecida uma cultura celular densa levando a uma melhor produtividade (ROSSI-ALVA et al., 2003). Enzimas de *Bacillus subtilis* foram imobilizadas por aprisionamento em cápsulas de gel de alginato de cálcio, sendo utilizadas como biocatalisador imobilizado para a produção semi-contínua de α -amilase (KONSOUOLA et al., 2006), permitindo cinco ciclos de reutilização. Estudo feito por (JADHAV et al., 2014) mostra que a atividade da enzima imobilizada em alginato de sódio adicionada de pululano foi de 85% após o quinto ciclo de reutilização em comparação com a enzima imobilizada apenas com alginato de sódio.

Dentre as diferentes técnicas de imobilização, o envolvimento em gel de alginato de sódio e outras matrizes poliméricas oferece muitas vantagens devido à sua simplicidade e caráter não-tóxico (GOKSUNGUR et al., 2001).

Os polissacárideos apresentam muitas características incluindo alta absorção de água, formação de filme e ligação cruzada com proteína. Estas características

podem ser potencialmente úteis para aumentar o rendimento de aprisionamento e estabilidade das enzimas nas esferas de alginato. Embora se verifique que as enzimas são estáveis em esferas, existe a possibilidade de aumentar a sua estabilidade juntamente com o rendimento de imobilização pelo uso de polissacarídeo na mistura de enzimas durante o aprisionamento (JADHAV et al., 2014). Existem relatos de α -amilases imobilizadas em diversos veículos e utilizadas em hidrólise de amido (SENYAY-ONCEL et al., 2013). Estudos também mostram que parâmetros operacionais, como pressão, temperatura, fluxo de CO₂ e duração do processo podem aumentar a atividade em 67,7% em condições otimizadas em comparação com a enzima não tratada (SENYAY-ONCEL et al., 2011).

7 REFERÊNCIAS

- AHMAD BAGHERI, REZA KHODARAHMI, ALI MOSTAFAIE. Purification and biochemical characterisation of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*: Relation to starch processing. **Food Chemistry** 161 (2014) 270–278
- ARCHANA SHARMA, T. SATYANARAYANA., 2013. Structural and biochemical features of acidic α -amylase of *Bacillus acidicola*. **International Journal of Biological Macromolecules** 61 (2013) 416– 423.
- A.M. OMEMU, I. AKPAN, M.O. BANKOLE, O.D. TENIOLA, Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM 07 isolated from soil. **African Journal of Biotechnology**. 4 (2005) 19-25.
- AIYER, P.V., 2005. Amylases and their applications. **African Journal of Biotechnology** 4, 1525–1529.
- A.TRAMICE, E. PAGNOTTA, I. ROMANO, A. GAMBACORTA, A. TRINCONE. Transglycosylation reactions using glycosyl hydrolases from *Thermotoga neapolitana*, a marine hydrogen-producing bacterium. Vol. 47 (2007), p.21-27.
- ASHOK PANDEY, GEORGE SZAKACS, CARLOS R. SOCCOL, JOSE A. RODRIGUEZ-LEON, VANETE T. SOCCOL. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**. Vol. 77, (2001), Pages 203–214.
- AHLAWAT, S.; DHIMAN, S.S.; BATTAN, B.; MANDHAN, R.P.; SHARMA, J. (2009). Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. **Process Biochemistry** 44, 521-526.
- BOURNEOW C, BENJAKUL S, H-KITTIKUN A (2012) Hydroxamate-based colorimetric method for direct screening of transglutaminaseproducing bacteria. **World J Microb Biot** 28:2273–2277.
- BUCHHOLZ, K., & SEIBEL, J. (2008). Industrial carbohydrate biotransformation. **Carbohydrate Research**, 343, 1966–1979.
- BINOD, PARAMESWARAN; PALKHIWALA, PIYUSH; GAIKAIWARI, RAGHAVENDRA; NAMPOOTHIRI, K MADHAVAN; DUGGAL, ARVIND; DEY, KAKALI; PANDEY, ASHOK. (2013). *Present status and future perspectives for India*. **JSIR** Vol.72(05) P.271-286.
- BOHDZIEWICZ, J., 1996. Ultrafiltration of technical amylolytic enzymes. **Process Biochemistry**, 31, 185-191.
- BECKS S, BIELAWASKI C, HENTON D, PADALA R, BURROWS K, SLABY R. Application of a liquid stable amylase reagent on the Ciba Corning Express clinical chemistry system. **Clin Chem** 1995;41:S186.

COSTANTINO VETRIANI, DENNIS L. MAEDER, NICOLA TOLLIDAY, KITTY S.-P. YIP, TIMOTHY J. STILLMAN, K. LINDA BRITTON, DAVID W. RICE, HORST H. KLUMP, FRANK T. ROBB. Protein thermostability above 100°C: A key role for ionic interactions. (1998). vol. 95 no. 21.

CHI, Z.; CHI, Z.; LIU, G.; WANG, F.; JU, L.; ZHANG, T. (2009). *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. **Biotechnol Adv** 27, 423-431.

CHEMICAL WEEKLY, 11 Feb 2014, 167 (Website: <http://www.chemicalweekly.com>)
© **Sevak Publications & Chemical Weekly Database P Ltd** 2014

CANTAREL, B .I., COUTINHO, P. M., RANCUREL, T., LOMBARD, V., HENRISSAT, B. 2009. The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Res.** 37, D233-D238.

DABA, T., KOJIMA, K., INOUE, K. 2013. Chemical modification of wheat β -amylase by trinitrobenzenesulfonic acid, methoxypolyethylene glycol, and glutaraldehyde to improve its thermal stability and activity. **Enzyme and Microbial Technology.** 53(6-7): 420-426.

DENIZ SENYAY-ONCEL, OZLEM YESIL-CELIK TAS. Treatment of immobilized α -amylase under supercritical CO₂ conditions: Can activity be enhanced after consecutive enzymatic reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** Vol 91, (2013), p.72–76.

DENIZ SENYAY-ONCEL, H. ERTAS, Ozlem Yesil-Celik tas. Effects of supercritical fluid extraction parameters on unsaturated fatty acid yields of Pistacia terebinthus berries. **Journal of the American Oil Chemists Society.** 2011, Vol. 88, p.1061-1069

D.S. RIBEIRO, S.M.B. HENRIQUE, L.S. OLIVEIRA, G.A. MACEDO, L.F. FLEURI. **Enzymes in juice processing:** a review. Vol. 45, (2010) Pages 635–641

DECLERCK, N., MACHIUS, M., WIEGAND, G., HUBER, R. & GAILLARDIN, C. (2000). **J. Mol. Biol.** 301, 1041–1057.

DE SALES, P. M., DE SOUZA, P. M., SIMEONI, L. A., MAGALHAES, P. O., & SILVEIRA, D. (2012). α -Amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 15, 141–183.

E. CEPEDA, M. HERMOSA, A. BALLESTEROS, Optimization of maltodextrin hydrolysis by glucoamylase in a batch reactor, **Biotechnol. Bioeng.** 76 (2001) 70–76.

FEITKENHAUER, H. (2003). Anaerobic digestion of desizing wastewater: influence of pretreatment and anionic surfactant on degradation and intermediate accumulation. **Enzyme Microb. Technol.** 33, 250-258.

FAZEKAS. E., SZABÓ, K., KANDRA, I., GYÉMÁNI, G. 2013. Unexpected mode of action of sweet potato β -amylase on maltooligomer substrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 1834(10): 1976-1981.

G. RAJAGOPALAN., C. KRISHNAN. α -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. (2008), **P.3044-3050**.

GIRI NY, MOHAN AR, RAO LV, RAO CP. Immobilization of α -amylase complex in detection of higher oligosaccharides on paper. **Curr Sci** 1990;59:1339/40.

GOYAL, N., GUPTA, J.K., SONI, S.K., 2005. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. **Enzyme Microb. Technol.** 37, 723–734.

G. DAVIES; B. HENRISSAT. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure** 15 September 1997, 3:85.3-859.

GUPTA, R; GIGRAS, P; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry** 38 (2003) 1599-1616

HOBBS L. 2009. Sweeteners from starch: production, properties and uses. In J. N. BeMiller & R. L. Whistler (eds.), *Starch: Chemistry and Technology* 3rd Ed. **Academic Press, Elsevier, London**, p. 797-832.

HMIDET, N.; EL-HADJ ALI, N.; HADDAR, A.; KANOUN, S.; ALYA, S.; NASRI, M. (2009). Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochemical Engineering Journal** 47, 71-79.

HENDRIKSEN HV, PEDERSEN S, BISGARD-FRANTZEN H. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. 1999. **Patent Application WO** 99/35325.

JIN, B., VAN LEEUWEN, J.H., PATEL, B., 1999. Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. **Process Biochem.** 34, 335–340.

JEAN-CAUDE BWANGANGA TAWABA., F. BÉRA., P. THONART. Optimizing red sorghum malt quality when *Bacillus subtilis* is used during steeping to control mould growth. 2012. Volume 118 Pages 295–304.

J.D. BLOOM, M.M. MEYER, P. MEINHOLD, C.R. OTEY, D. MACMILLAN, F.H. ARNOLD. Evolving strategies for enzyme engineering. Vol.15 (2005) p.447-452.

JUAN CARLOS ROSSI-ALVA, MARIA HELENA MIGUEZ ROCHA-LEÃO. A strategic study using mutant-strain entrapment in calcium alginate for the production of *Saccharomyces cerevisiae* cells with high invertase activity. Volume 38, (2003), p.43–51.

KOLAWOLE AND COLLEAGUES. Purification and characterization of alkaline-stable beta-amylase in malted African finger millet (*Eleusine coracana*). **Process Biochemistry**. 2011; 46(11):2178-2186.

KUMAGAI, Y., SATOH, T., INOUE, A., OJIMA, T. (2013). Enzymatic properties and primary structures of two α -amylase isozymes from the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 164 (2013) 80–88

K.C. GULLA, M.D. GOUDA, M.S. THAKUR, N.G. KARANTH. Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. **Biosensors and Bioelectronics**. Vol.19, (2004), p. 621–625

KULP, K., & PONTE, J. G. (1981). Staling of white pan bread: Fundamental causes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 15, 1–48.

LIN, L.L., HSU, W.H., CHU, W.S., 1997. A gene encoding for α -amylase From thermophilic *Bacillus* sp. Strain TS-23 And its expression in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology** 82, 325–334.

L.K. BOWLES, Amylolytic enzymes, in: R.E. Hebeda, H.F. Zobel (Eds.), Baked Goods Freshness, Technology, Evaluation, and Inhibition of Staling, **Marcel Dekker, New York**, 1996, pp. 105–129.

MAEDA, T., HASHIMOTO, T., MINODA, M., TAMAGAWA, S., & MORITA, N. (2003). Effects of mutant thermostable α -amylase on rheological properties of wheat dough and bread. **Cereal Chemistry**, 80, 722–727.

MARKETS AND MARKETS, 2014. **Found on PR Newswire**, 1 Mar 2014, (Website: <http://www.prnewswire.com>)

MAITY, C., SAMANTA, S., HALDER, S.K., DAS MOHAPATRA, P.K., PATI, B.R., MONDAL, K.C., 2011. Isozymes Of α -amylases From newly Isolated *Bacillus Thuringiensis* CKB19: Production from immobilized cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** 16, 312–319.

MITIDIERI, S.; SOUZA MARTINELLI, A.H.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresour Technol** 97, 1217-1224.

MOHSEN MOBINI-DEHKORDI, FAHIME AFZAL JAVAN. Application of alpha-amylase in biotechnology. *J. Biol.* **Today's World**. 2012 Nov; 1 (1): 15-20

M.J.E.C. VAN DER MAAREL, B. VAN DER VEEN, J.C.M. UITDEHAAG, H. LEEMHUIS, L. DIJKHUIZEN, Properties and application of starch-converting enzymes of the α -amylase family, **J. Biotechnol.** 94 (2002) 137–155.

MINAKSHI&PUNDIR, C S. Co-immobilization of lipase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate oxidase and peroxidase on to aryl amine glass beads affixed on plastic strip for determination of triglycerides in serum. Vol.45(2) (2008).

MORAES, L.M.P.; FILHO, S.A.; ULHOA, C.J. (1999). Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 15, 561-564.

M. ANTONIA MARTÍNEZ-ANAYA, TERESA JIMÉNEZ. Rheological properties of enzyme supplemented doughs. Volume 28, Issue 5 November 1997 Pages 569–583.

MARTÍNEZ-ANAYA, M. A., & JIMÉNEZ, T. (1997). Functionality of enzymes that hydrolyse starch and non-starch polysaccharide in breadmaking. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**,205, 209–214.

MARC J.E.C VAN DER MAAREL, BART VAN DER VEEN, JOOST C.M UITDEHAAG, HANS LEEMHUIS, L DIJKHUIZEN. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**. Volume 94, (2002), Pages 137–155.

M.S. HEMALATHA., LEELAVATHI KRISHNARAU. Influence of amylases and xylanase on chemical, sensory, amylograph properties and microstructure of chapatti. **Article in LWT- Food Science and Technology** 43(9):1394-1402 (2010).

NS REDDY, ANNAPOORNA NIMMAGADDA, K. R. S. SAMBASIVA RAO. *An overview of the microbial α -amylase family.* **African Journal of Biotechnology** Vol. 2 (12), pp. 645-648, (2003).

ÖNER, E.T. (2006). Optimization of ethanol production from starch by an amylolytic nuclear petite *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**23, 849-856.

OLAOYE, O. S.; KOLAWOLE, O. S. Modeling of the kinetic of ethanol formation from glucose biomass in batch culture with a non structured model. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 3, n. 4, p. 562-565, 2013.

OLGA LUISA TAVANOA, ROBERTO FERNANDEZ-LAFUENTE, ANTONIO JOSÉ GOULART, RUBENS MONTI. Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose support. Characterization of the immobilized enzyme. **Process Biochemistry** 48 (2013) 1054–1058.

OLE KIRK, TORBEN VEDEL BORCHERT, CLAUS CRONE FUGLSANG. **Industrial enzyme applications**. Vol.13 (2002), p. 345-351.

P. FERNANDES. Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts. Volume 2010 (2010), Article ID 862537, 19 pages.

PANDEY; P. BINOD; P. PIYUSSH; G. RAGHAVENDRA; N. K. MADHAVAN; D. ARVIND; D. KAKALLI. Industrial Enzymes - Present status and future perspectives for India. **JSIR** Vol.72(05) [May 2013] 271-286

PANDEY A, RAMACHANDRAN S. GENERAL INTRODUCTION. IN: PANDEY A, WEBB C, SOCCOL CR, LARROCHE C. **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech Publishers; 2005. p. 1–10.

PANDEY A, NIGAM P, SOCCOL CR, SOCCOL VT, SINGH D, MOHAN R. Advances in microbial amylases. **Biotechnol Appl Biochem** 2000;31:135-52.

PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C.R., SOCCOL, T.V., SINGH, D., MOHAN, R., 2000. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry** 31, 135–152.

R. KAMMOUN, B. NAILI, S. BEJAR, BIORESOUR. **Technol.** **99** (13) (2008) 5602–5609.

ROOHI, KUDDUS, M., Bio-statistical approach for optimization of cold-active α -amylase production by novel psychrotolerant *M. foliorum* GA2 in solid state fermentation. **Biocatal. Agric. Biotechnol** (2013).

R. KAMMOUN., B. NAILI., S. BEJAR. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology**. Volume 99 (2008), Pages 5602–5609.

RANUM, P., & DESTEFANIS, V. A. (1990). Use of fungal α -amylase in milling and baking. **Cereal Food World**, 35, 931–933.

ROBYT JF. 2009. Enzymes and their action on starch. In J. N. BeMiller & R. L. Whistler (eds.), *Starch: Chemistry and Technology* **3rd Ed.** **Academic Press, Elsevier, London**, p. 238-292.

SHARMA, A., SATYANARAYANA, T. (2012). Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications.

SI, J. Q. (1997). Synergistic effect of enzymes for breadbaking. **Cereal Foods World**, 42, 802–807.

SHUANG LI, XIAOFENG YANG, SHUAI YANG, MUZI ZHU, XIAONING WANG. TECHNOLOGY PROSPECTING ON ENZYMES: **APPLICATION, MARKETING AND ENGINEERING**. Volume No: 2, Issue: 3, (2012)

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industryBraz. **J. Microbiol.** vol.41 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2010.

STANLEY P. CAUVAIN. Author links open the author workspace.Norman Chamberlain. The bread improving effect of fungal α -amylase. **Journal of Cereal Science**Volume 8, Issue 3, November 1988, Pages 239-248.

SIVARAMAKRISHNAN, S., GANGADHARAN, D., NAMPOOTHIRI, K. M., SOCCOL, C. R., & PANDEY, A. (2006). α -Amylases from microbial sources – an overview on recent developments. **Food Technology and Biotechnology**, 44, 173–184.

S. DJEKIRIF-DAKHMOCHE., Z. GHERIBI-AOULMI., Z. MERAIHI., L. BENNAMOUN. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Engineering**.Volume 73, (2006), Pages 190–197.

SWATI B. JADHAV,REKHA S. SINGHA.Pullulan-complexed α -amylase and glucosidase in alginate beads: Enhanced entrapment and stability. **Carbohydrate Polymers**.Vol.105, (2014), p. 49–56

TANGPHATSORNRUANG, S., NACONSIE, M., THAMMARONGTHAM, C., & NARANGAJAVANA, J. (2005). Isolation and characterization of an α -amylase gene in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Physiology and Biochemistry**, 43, 821–827.

YANG CH, LIU WH. Purification and properties of a maltotrioseproducing α -amylase from *Thermobifida fusca*. **Enzyme Microb Technol** 2004;35:254–60.

WIM J. Quax. Bacterial Enzymes. **Prokaryotes** (2006) 1:777-796

YEKTA GÖKSUNGUR, NEŞE ZORLU. Production of Ethanol from Beet Molasses by Ca-Alginate Immobilized Yeast Cells in a Packed-Bed Bioreactor. 25 (2001) 265-275.

V. RANA; A. D. ECKARD; P. TELLER; B. K. AHRING. On-site enzymes produced from *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus saccharolyticus* for hydrolysis of wet exploded corn stover and loblolly pine. V.154 (2014),p. 282-289.

VIHINEN M, MANTSALA P (1989). Microbial amylolytic enzymes. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** 24:329- 418.

V.V. MOZHAEV., KAREL MARTINEK. Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. **Enzyme and Microbial Technology** Vol. 6, (1984), p. 50-59.

ZOE KONSOLA, MARIA LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES. Thermostable α -amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules. **Enzyme and Microbial Technology** 39 (2006) 690–696.

CAPÍTULO II. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE AMILASES

Foram investigadas 11 linhagens de microrganismos da coleção de culturas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná para avaliação quanto à sua capacidade de produção de amilase. Dentre as cepas avaliadas, a de *Aspergillus oryzae* LPB 5593 alcançou 199 U.mL^{-1} , sendo a maior produção de amilase em meio sintético. A cepa selecionada foi então utilizada em fermentação submersa nas etapas de otimização do processo. Delineamentos experimentais foram aplicados com o objetivo de determinar a composição do meio de produção de α -amilase. A melhor condição de produção em frascos Erlenmeyer de 250 mL foi obtida com meio composto por (g.L^{-1}): amido 2,5; sulfato de amônio 0,56; ureia 0,1; com pH inicial de 6,2 a 29°C , propiciando aumento de 54% e chegando-se a uma atividade enzimática de 780 U.mL^{-1} após 76 horas de fermentação. A produção de α -amilase foi igualmente realizada em biorreatores de bancada do tipo STR (7 L) e coluna de bolhas (1 L), alcançando atividades de 349 U.mL^{-1} e 768 U.mL^{-1} respectivamente. Tal fato demonstra que a agitação pneumática favoreceu o crescimento e, conseqüentemente, a produção da enzima. A α -amilase produzida foi purificada e concentrada em sistema de membranas de microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF) Pellicon II. Após MF e UF em membrana de 30 kDa o extrato enzimático foi concentrado em 20% com uma taxa de recuperação de 97,7%. A técnica SDS-PAGE indicou que a α -amilase possui massa molecular próxima de 30 kDa. O extrato enzimático bruto apresentou pH e temperatura ótimos de 5 e 50°C , respectivamente.

1 INTRODUÇÃO

A amilase é uma enzima com forte potencial de aplicação em diversas áreas da indústria, seja na hidrólise enzimática de materiais amiláceos para a produção de combustíveis, na indústria de papel e detergentes, ração animal, têxtil ou farmacêutica. Contudo, a sua aplicação na indústria de alimentos é consolidada.

As amilases são enzimas amilolíticas capazes de hidrolisar as ligações α -1,4 e α -1,6 glicosídica degradando de forma randômica o substrato amido, composto por amilose e amilopectina gerando glicose, maltose, e uma mistura de malto-oligossacarídeos (LONSANE *et al.*, 1990; YANG *et al.*, 2004). As amilases estão entre as mais importantes enzimas de conversão de amido, e elas podem ser derivadas de várias fontes, tais como fungos, bactérias, leveduras, mas a principal fonte comercial são os fungos filamentosos devido às altas concentrações de enzima secretadas no meio (POLIZELI *et al.*, 2005; HASHEMI, *et al.*, 2010). Um exemplo é o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* produtor de enzimas, tais como amilases, celulasas, mananases e xilanases. Este fungo quando cultivado em substrato rico em amido (trigo, aveia, cevada e outros) é capaz de produzir enzimas amilolíticas extracelularmente.

Etapas de produção de enzimas, separação, purificação e formulação são de primordial importância devido ao seu impacto na economia e na viabilidade do processo. Processos de fermentação submersa (FSm) ou fermentação em estado sólido (FES) podem ser empregados para a produção de enzimas industriais, utilizando diversas espécies microbianas e os mais variados substratos. Na fermentação industrial, a escolha do modo de operação do biorreator (batelada, alimentada ou contínuo) é vital para a otimização do processo. Certamente, a escolha do tipo do biorreator é igualmente importante, onde se pode optar pela agitação mecânica (reator do tipo tanque agitado ou STR) ou pneumática (coluna de bolhas ou *airlift*), a depender do tipo de células empregadas no processo e sua susceptibilidade ao cisalhamento.

Um grande obstáculo para a aplicação de enzimas em processos industriais é o seu custo, que pode variar de 30-40% dependendo das condições de produção da enzima (JOO e CHANG, 2005). As indústrias alimentares, de bebidas e

agroindústrias produzem grandes quantidades de resíduos que representam graves problemas ambientais e poderiam ser utilizados como fonte de nutrientes e biomassa (PURO et al., 2013) para a produção de enzimas. Para tal, um grande número de resíduos ou subprodutos agroindustriais tem sido explorados tais como farelo de trigo, espiga de milho, palha de trigo, casca de arroz, bagaço de malte, bagaço de cana entre outros (POLIZEI et al, 2005; KNOB et al. 2014). Contudo, etapas de separação e purificação podem ser mais complicadas quando do uso de substratos agroindustriais, sendo que a produção a partir de meios sintéticos pode facilitar estas etapas do processo.

Os processos de *downstream* (separação, concentração e purificação) constituem etapas importantes do processo para obtenção de enzimas. O custo destes processos é geralmente superior a 50% do custo total de produção das enzimas e compreende processos como centrifugação, precipitação, extração com solventes, adsorção, filtração por membranas, cromatografia, cristalização, liofilização e *spray-drying* (NAJAFPOUR, 2007; CUNHA et al. 2002). Algumas aplicações comerciais de amilases não requerem que a enzima seja altamente purificada, porém nos setores farmacêutico e clínico há exigência por alta pureza (SHARMA et al., 2013).

A primeira etapa na extração das enzimas a partir do meio de fermentação é a remoção de compostos insolúveis, principalmente as células microbianas. Isso normalmente é feito por centrifugação ou microfiltração (CHOTANI et al., 2006). As enzimas presentes no caldo fermentativo são, em seguida, purificadas e concentradas por evaporação ou filtração por membranas (ultrafiltração) com porosidades adaptadas ao tamanho da proteína de interesse, dependendo da aplicação pretendida. As principais vantagens dos processos de separação por membranas envolvem a economia de energia, pois promovem a separação sem que ocorra mudança de fase, bem como a especificidade e seletividade da membrana. Outra vantagem é que os processos são conduzidos sem a necessidade de se utilizar temperaturas elevadas, podendo ser aplicados no fracionamento de misturas de substâncias termossensíveis. Esses processos apresentam, ainda, a vantagem de serem extremamente simples sob o ponto de vista operacional e em termos de ampliação de escala (HABERT, BORGES e NOBREGA, 2006).

A purificação de amilase foi estudada utilizando sistemas de processamento sequencial de membranas que incluíam microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF) (CASSANO et al., 2003; HOWELL et al., 1993; SÁ et al., 2003). Se forem necessárias preparações de enzimas puras, por exemplo, para fins de investigação e desenvolvimento, elas são geralmente separadas por diferentes técnicas de cromatografia (STRAATHOF, 2011). A determinação da massa molar é então realizada por eletroforese, com a possibilidade de sequenciamento e identificação da proteína.

Neste capítulo são apresentados estudos da produção por fermentação submersa (FSm), separação e purificação em sistema de membranas e determinação da massa molar de α -amilases produzidas por linhagem selecionada de fungo filamentoso.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 SELEÇÃO DE CEPAS PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASES

2.1.1 Seleção de microrganismos para produção de α -amilase

Onze cepas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná foram testadas para a produção de α -amilase (Tabela 2.1).

TABELA 2.1 - CEPAS INVESTIGADAS PARA PRODUÇÃO DE α -AMILASE

Microrganismos	Códigos Cepas LPB
<i>Aspergillus oryzae</i>	LPB 5593
<i>Aspergillus oryzae</i>	LPB 2217
<i>Aspergillus niger</i>	LPB IZ9
<i>Aspergillus niger</i>	LPB 28
<i>Aspergillus niger</i>	LPB W12
<i>Rhizopus</i> sp	LPB 395
<i>Aspergillus oryzae</i>	LPB 2220
<i>Rhizopus</i> sp	LPB 3562
<i>Rhizopus</i> sp	LPB 25976
<i>Rhizopus</i> sp	LPB 28168
<i>Rhizopus</i> sp	LPB 28627

As cepas foram ativadas por meio de repiques em tubos contendo meio PDA (*Potato Agar Dextrose*) inclinado, os quais foram incubados em estufa por até 7 dias a 30°C. Após o cultivo, foram armazenados sob refrigeração a 4°C com repiques constantes para sua manutenção. As cepas foram igualmente conservadas por técnicas de congelamento.

2.1.2 Seleção qualitativa de cepas produtoras de α -amilase

Com o objetivo de selecionar as melhores cepas produtoras de α -amilase, as linhagens relacionadas na Tabela 2.1 foram incubadas em meio sólido contendo amido com a seguinte composição: 1% (m/v) de amido, 0,5% peptona, 0,15% extrato de levedura, 0,5% cloreto de sódio, 0,05% sulfato de magnésio hepta hidratado, 0,1% fosfato dissódico e 1,5% Ágar (SANTOS et al., 2003).

As cepas foram repicadas no centro de placas de Petri, com a transferência de preferencialmente um esporo para que houvesse a formação de uma colônia. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 29°C durante 7 dias. Após o crescimento da colônia, a capacidade de degradação do amido contido no meio de cultivo e, conseqüentemente, a produção da enzima α -amilase foi avaliada com a

medida do halo formado. O esquema geral da pré-seleção pode ser observado na Figura 2.1.

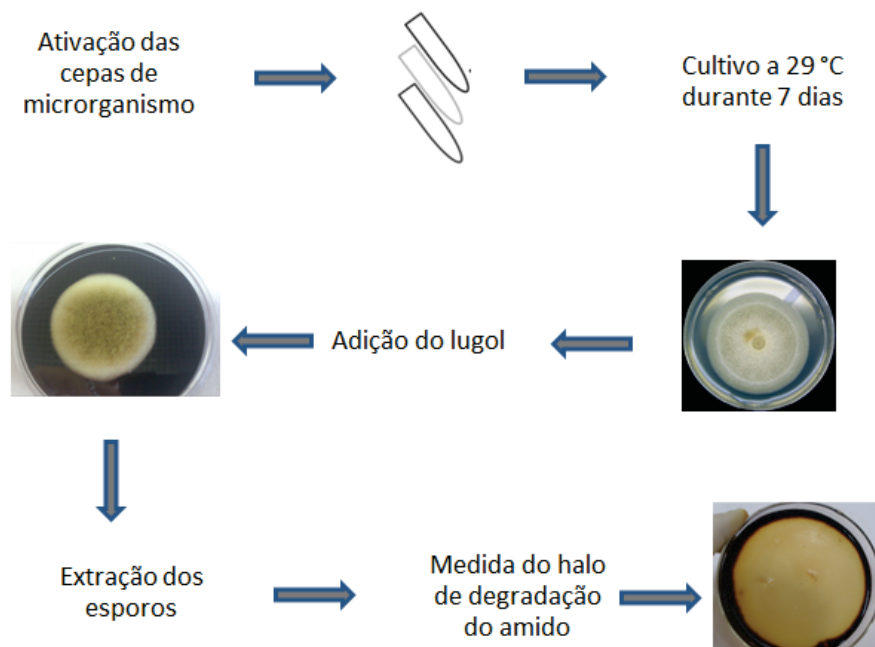


FIGURA 2.1 - SELEÇÃO QUALITATIVA DE CEPAS PRODUTORAS DE α -AMILASES (Fonte: O autor, 2017)

2.1.3 Preparo do inóculo para a produção de α -amilase

As cepas fúngicas foram incubadas durante 7 dias em meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*) a 29°C. Em seguida, fez-se a extração dos esporos por suspensão em água em solução de Tween 80 0,1%, sob agitação em agitador magnético. Após a extração, a suspensão foi submetida a diluições sucessivas para determinação da concentração de esporos em câmara de Neubauer.

2.1.4 Seleção quantitativa de cepas produtoras de α -amilase

As cepas foram avaliadas em provas fermentativas quanto à sua capacidade de produção de α -amilase. As linhagens selecionadas no teste qualitativo, foram submetidas a testes fermentativos em meio líquido de composição (g.L⁻¹) amido 1,0; KH₂PO₄ 0,2; (NH₄)₂SO₄ 0,14; CaCl₂ 0,03; MgSO₄.7H₂O 0,03; ureia 0,03; peptona 0,1

(GUPTA et al., 2010). Os frascos foram incubados a 29°C, em shaker sob agitação de 120 rpm durante 4 dias. A inoculação se deu a uma taxa de 10^7 esporos.mL⁻¹. Após a fermentação, o meio fermentado foi filtrado em papel Whatman n°1 e a atividade amilásica foi determinada (ver seção 2.1.5). Na Figura 2.2 estão resumidas as etapas realizadas para a seleção quantitativa de cepas produtoras de α -amilase.

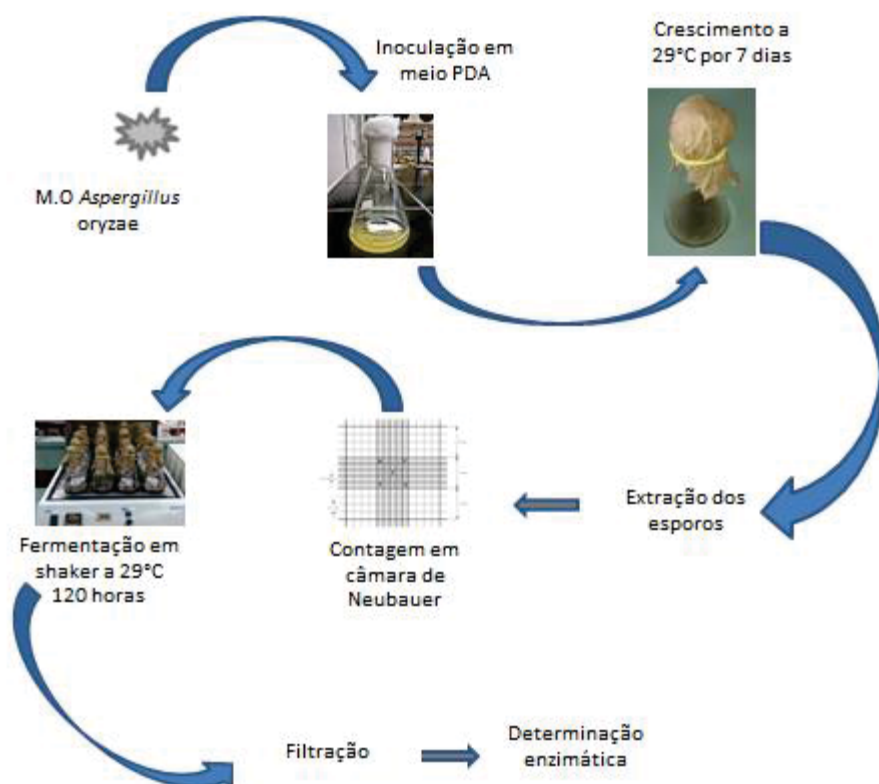


FIGURA 2.2. ESQUEMA GERAL DAS ETAPAS REALIZADAS PARA A SELEÇÃO DE CEPAS PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE (Fonte: O autor, 2017)

2.1.5 Determinação da atividade amilásica

A atividade da amilase (JENSEN e OLSEN 2003; RAMESH and LONSANE 1989) foi determinada pela incubação de 0,5 mL de amido solúvel 1%(m/v), substrato padrão, em tampão fosfato de sódio pH 7 com 0,5 mL do extrato enzimático diluído. Após 10 minutos de incubação a 37°C foi adicionado 1 mL DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e submetido à ebulição em banho-maria por 5 minutos.

Em seguida, o conteúdo foi resfriado, foram adicionados 3,5 mL de água destilada. O conteúdo foi homogeneizado para a leitura a 540 nm em espectrofotômetro para determinação de açúcares redutores (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária de amilase que libera o equivalente a 1 μmol de maltose por minuto nas condições mencionadas.

2.2 ESTUDO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR *ASPERGILLUS oryzae* LPB 5593

A produção de α -amilase foi realizada por *Aspergillus oryzae* LPB 5593, cepa selecionada previamente, em fermentação submersa utilizando meio de cultivo com a seguinte composição (g.L^{-1}): amido 1,0; KH_2PO_4 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,14; CaCl_2 0,03; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03; ureia 0,03; peptona 0,1 (GUPTA et al., 2010). Os frascos de Erlenmeyer foram inoculados e incubados por 5 dias a 29°C sob agitação de 120 rpm.

Após a fermentação, a biomassa foi separada por meio de filtração em papel de filtro Whatman nº 1. O extrato enzimático bruto foi então analisado para a determinação da atividade enzimática conforme item 2.1.5

2.3 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR *ASPERGILLUS oryzae* LPB 5593 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

2.3.1 Influência da concentração de amido como fonte de carbono sobre a produção de α -amilase

Numa tentativa de otimizar a produção de α -amilase por *Aspergillus oryzae* LPB 5593, foram avaliadas diferentes concentrações de amido a serem adicionadas ao meio sintético, descrito item 2.2, em (g.L^{-1}): 1; 1,5; 2; 2,5; 3; e 3,5. O meio de cultivo preparado com as diferentes concentrações de amido foi disposto em frascos de Erlenmeyer de 250 mL e inoculado para a produção de α -amilase de acordo com o item 2.2.

2.3.2 Influência da fonte de nitrogênio sobre a produção de α -amilase

Esse grupo de experimentos teve como objetivo a escolha da(s) melhor (es) fontes de nitrogênio para a produção de α -amilase. Diferentes fontes de nitrogênio foram avaliadas de forma a suplementar o meio sintético até aqui utilizado para a produção da enzima (de acordo com item 2.2). As concentrações destas fontes foram calculadas com base na sua composição em massa de nitrogênio. Os experimentos foram realizados em triplicata da seguinte maneira: meio utilizado como controle adicionado das seguintes fontes de nitrogênio separadamente: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,14 g/L), ureia $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (0,03 g/L) e peptona (0,1 g/L), mantendo-se fixa a concentração de amido (g/L). Os frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de produção esterilizado, foram inoculados e incubados sob agitação de 120 rpm a 29°C durante 4 dias.

2.3.3 Otimização da composição do meio de cultivo para produção de α -amilase

Para avaliar a influência da concentração das fontes de carbono e nitrogênio, previamente selecionadas, na produção de α -amilase por FSm foi estabelecido um delineamento experimental, utilizando planejamento fatorial completo (2^4) com Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e seis pontos centrais, totalizando 30 experimentos.

As concentrações da fonte de carbono amido, e das fontes de nitrogênio sulfato de amônio, ureia e peptona foram variadas de acordo com níveis apresentados na Tabela 2.2. O nível (-1) foi definido como concentração já utilizada de cada componente estudado e o nível (+1) teve sua concentração aumentada, de modo a se avaliar a influência de cada um sobre a atividade de amilase.

TABELA 2.2. NÍVEIS DOS FATORES ESTUDADOS NO ESTUDO DA INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR *A. oryzae* NRRL 5593 EM FSm

Variáveis independentes (g/L)	Símbolo	Níveis				
		-2	-1	0	1	2
Amido	—	5	15	25	35	45
Sulfato de amônio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0	1,4	2,8	4,2	5,6
Uréia	$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	0	0,5	1	1,5	2
Peptona	—	0	1	2	3	4

O meio de cultivo foi preparado nas diferentes condições e disposto em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, em um volume de 100 mL de meio, e inoculado para a produção de α -amilase de acordo com o item 2.2.

2.3.4 Estudo da cinética de produção de α -amilase em frascos de Erlenmeyer

A partir da otimização do meio de produção de α -amilase, realizou-se o estudo da cinética de produção por FSm em frascos de Erlenmeyer. Os frascos foram incubados sob agitação de 120 rpm a 29°C durante 120 horas. A composição do meio utilizado foi em (g.L⁻¹): amido 2,5; KH₂PO₄ 0,2; (NH₄)₂SO₄ 0,56; CaCl₂ 0,03; MgSO₄.7H₂O 0,03; ureia 1; peptona 2. Os ensaios foram realizados em duplicata. A atividade enzimática das amostras foi analisada de acordo com o item 2.1.5. Os valores de pH, açúcares redutores e biomassa foram avaliados a cada 24 horas entre os tempos 0 horas e 120 horas de fermentação.

2.4 PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM DIFERENTES TIPOS DE BIORREATORES

2.4.1 Produção de α -amilase por FSm em biorreator do tipo tanque agitado – STR

O processo de produção de α -amilase por FSm foi conduzido em biorreator de 7,5 L modelo MDL 750(B.E. MARUBISHI Thailand Co., Ltd.), agitado por 2 turbinas de Rushton do tipo pás planas (Figura 2.3).



FIGURA 2.3 - BIORREATOR MODELO MDL 750 (B. E. MARUBISHI THAILAND Co. Ltda.), UTILIZADO PARA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR FSm

A fermentação foi conduzida utilizando a composição do meio de produção, definida anteriormente, em frascos de Erlenmeyer. Fez-se necessário a definição das condições de agitação e aeração. Para o controle da formação de espumas foi utilizado o antiespumante comercial Nitrofoam (Nitrogenius).

Após esterilização em autoclave a 121°C durante 40 minutos e resfriamento até aproximadamente 25°C , o biorreator foi inoculado com a suspensão de esporos de *Aspergillus oryzae* LPB 5593 de forma a se obter uma taxa de inoculação de 10^7 esporos. mL^{-1} . A fermentação foi realizada em um período de 120 horas a uma temperatura de 29°C .

Foram avaliadas diferentes condições de aeração (entre 0,5 e 4 vvm – volume de ar por volume de meio por minuto) e de agitação (entre 80 e 150 rpm) de maneira a se estudar a sua influência sobre a produção de α -amilase.

Amostras foram retiradas a cada 24 horas, filtradas e submetidas à determinação da atividade enzimática conforme o subitem 2.1.5.

2.4.2 Produção de α -amilase por FSm em biorreator do tipo coluna de bolhas (BCR)

A produção de α -amilase foi conduzida em biorreator do tipo coluna de bolhas (Figura 2.4), desenvolvido no laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia por OLIVEIRA (2012), tendo como objetivo avaliar o seu desempenho na produção de α -amilase por FSm. As fermentações foram realizadas utilizando meio de produção definido anteriormente.

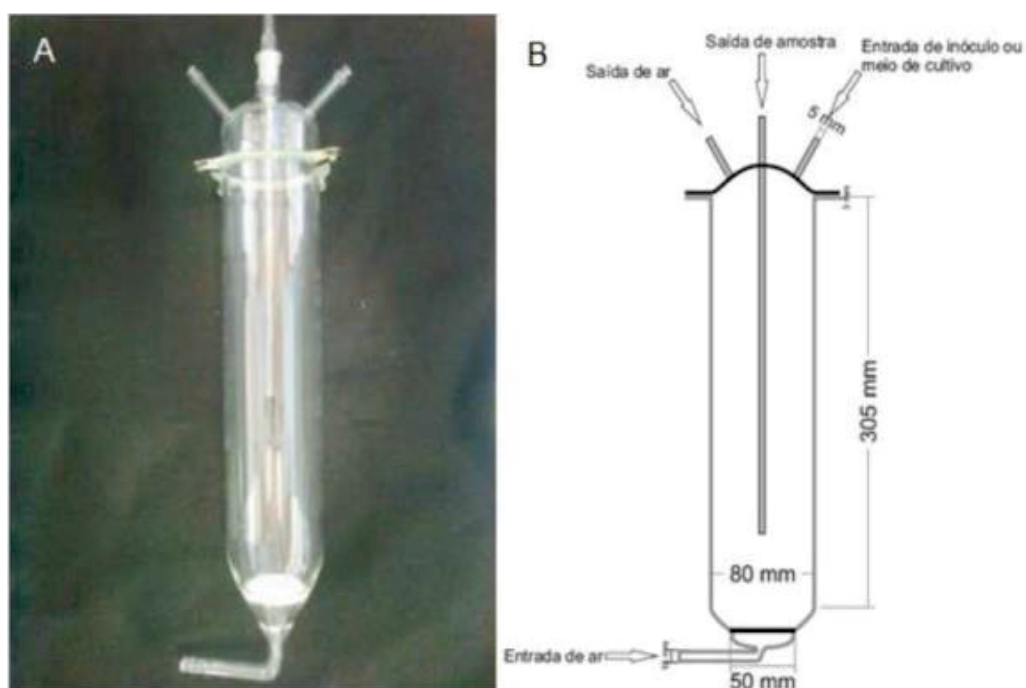


FIGURA 2.4 - A) BIORREATOR DO TIPO COLUNA DE BOLHAS PROJETADO NO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA. B) PROJETO DO BIORREATOR DE 1,5 L COM RESPECTIVAS MEDIDAS FONTE: OLIVEIRA (2012).

Após esterilização em autoclave a 121°C durante 15 minutos e resfriamento até aproximadamente 25°C, a suspensão de esporos de *Aspergillus oryzae* LPB5593 foi adicionada ao BCR de forma a se obter uma taxa de inoculação de 10^7 esporos.mL⁻¹. O processo de aeração e homogeneização do meio fermentativo se deu por meio da injeção de ar estéril a uma taxa de aeração de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto). As colunas foram incubadas com controle de

temperatura (29 °C) por até 120 horas. Para o controle da formação de espumas foi utilizado o antiespumante comercial Nitrofoam (Nitrogenius).

Amostras foram retiradas a cada 24 horas, filtradas e submetidas à determinação da atividade enzimática conforme o subitem 2.1.5. Os valores de pH, açúcares redutores e biomassa foram avaliados.

2.5 SEPARAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA α -AMILASE

2.5.1 Microfiltração do extrato enzimático em sistema de membranas Pellicon II

Após fermentação submersa, o extrato bruto enzimático contendo amilase foi filtrado através de microfiltração em Sistema de Filtração a Vácuo (Vacuum Driven Filters K15-1250 - KASVI), utilizando membrana de PES 0,45 μ m com capacidade total de 250 mL. As frações do retido e permeado foram analisadas quanto à atividade de amilase, concentração de proteína e determinação da atividade específica. Todas as frações, retido e permeado, foram analisadas quanto à atividade enzimática, proteínas totais, atividade específica e fator de purificação.

2.5.2 Ultrafiltração do extrato enzimático em sistema de membranas Pellicon II

Para purificação do extrato enzimático microfiltrado este foi submetido à separação no sistema de membranas Pellicon 2 (Millipore). O teste de separação ocorreu com membranas do tipo cassetes de fluxo tangencial de corte de massa molecular (30 kDa). Todo o processo foi conduzido com a utilização de banhos de gelo para melhor conservação das propriedades da enzima. Todas as frações, retido e permeado, foram analisadas quanto à atividade enzimática, proteínas totais, atividade específica e fator de purificação.

2.5.2 Determinação da massa molar por SDS-PAGE

A técnica de separação em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), das amostras de retido e permeado obtidas no sistema de membranas, foi realizada em gel de 1mm de espessura na concentração de 12% (LAEMMLI, 1970). O experimento foi realizado com o kit de eletroforese da BIO-RAD decuba vertical. Os padrões de massa molecular utilizados foram da marca Fermentas (Thermo Scientific) na faixa de 10-200 kDa.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SELEÇÃO QUALITATIVA DE CEPAS PRODUTORAS DE α -AMILASE

Visando a implantação de processo industrial para produção de α -amilase, os resultados apresentados a seguir mostram estudos realizados para sua produção por fermentação submersa. Nesta etapa do trabalho, as cepas foram testadas quanto à sua capacidade de produção de amilase utilizando como substrato meio sólido contendo amido em sua composição. Os testes de seleção qualitativa foram realizados com 11 cepas, conforme descrito em (2.1.2). Todas as cepas apresentaram resultados positivos para a produção de amilase.

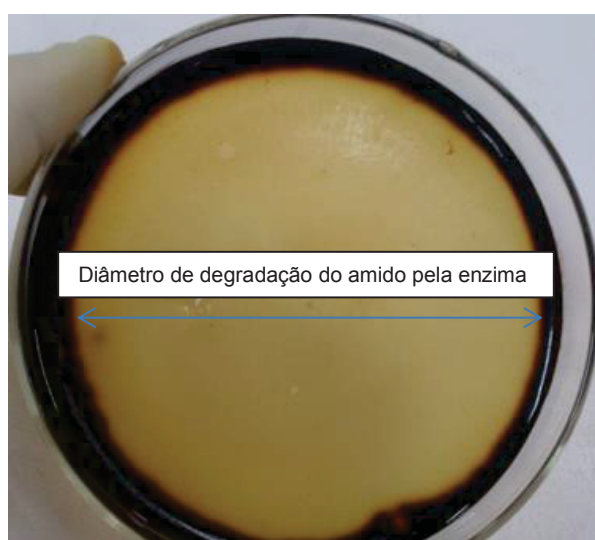


FIGURA 2.5 - DEGRADAÇÃO DO AMIDO PELA AMILASE PRODUZIDA POR *Aspergillus oryzae* LPB 5593

De acordo com a Tabela 2.3, a cepa *Aspergillus oryzae* LPB 5593 apresenta-se como uma possível produtora de amilase e com grande capacidade de degradação do amido, a qual foi observada pela formação do halo transparente de 50,6 mm após tempo de incubação de 120 horas. A segunda melhor cepa *Aspergillus oryzae* LPB 2217 apresentou halo de 35,4 mm.

TABELA 2.3 - SELEÇÃO QUALITATIVA DE CEPAS PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE

Cepas LPB	Diâmetro dos halos em milímetros (mm)
<i>Aspergillus oryzae</i> LPB 5593	50,6
<i>Aspergillus oryzae</i> LPB 2217	35,4
<i>Aspergillus niger</i> LPB IZ9	33,2
<i>Aspergillus niger</i> LPB 28	30,8
<i>Aspergillus niger</i> LPB W12	28,4
<i>Rhizopus</i> sp LPB 395	26,4
<i>Aspergillus oryzae</i> LPB 2220	24,6
<i>Rhizopus</i> sp LPB 3562	20,4
<i>Rhizopus</i> sp LPB 25976	14,2
<i>Rhizopus</i> sp LPB 28168	13,8
<i>Rhizopus</i> sp LPB 28627	12,6

Na Figura 2.6 pode-se observar os resultados de velocidade de crescimento radial analisado pelo aumento do diâmetro do micélio das cepas (mm) em função do tempo (horas) a temperatura de 29°C.

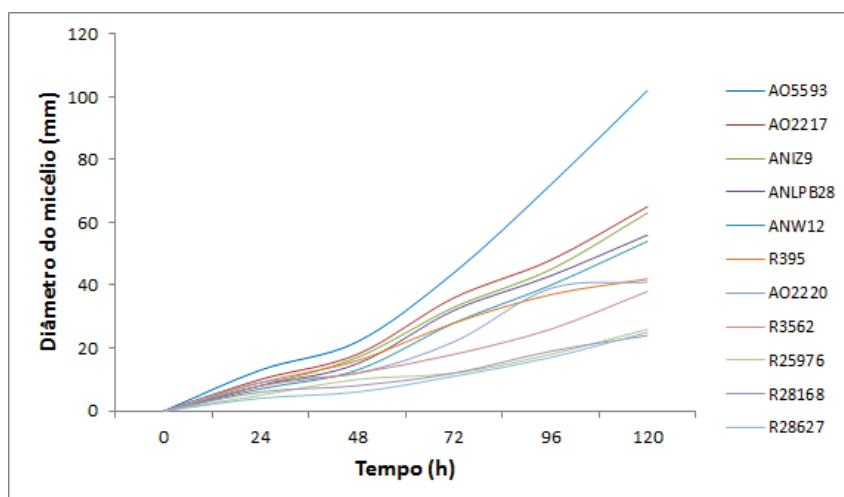


FIGURA 2.6 - VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DAS CEPAS TESTADAS PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE EM MEIO À BASE DE AMIDO

As velocidades de crescimento radial apresentadas pelos fungos *Aspergillus oryzae* LPB 5593, *Aspergillus oryzae* LPB 2217, *Aspergillus niger* LPB IZ9, *Aspergillus niger* LPB 28, *Aspergillus niger* LPB W12, *Rhizopus* sp LPB 395, *Aspergillus oryzae* LPB 2220, *Rhizopus* sp LPB 3562, *Rhizopus* sp LPB 25976, *Rhizopus* sp LPB 28168, *Rhizopus* sp LPB 28627 indicam a habilidade destes fungos de crescerem em meios contendo amido como fonte de carbono.

O tempo total de monitoramento do crescimento foi de 120 horas, momento em que o micélio da cepa *Aspergillus oryzae* LPB 5593 preencheu completamente toda superfície da placa de Petri, com 98 mm de diâmetro. Dentre as cepas avaliadas, observou-se que a cepa de *Aspergillus oryzae* LPB 5593 apresentou a maior velocidade de crescimento ($0,85 \text{ mm.h}^{-1}$), seguida por *Aspergillus oryzae* LPB 2217 ($0,54 \text{ mm.h}^{-1}$) e *Aspergillus niger* LPB IZ9 ($0,52 \text{ mm.h}^{-1}$).

A cepa de *Aspergillus oryzae* LPB 5593 apresentou a maior velocidade de crescimento radial no meio avaliado em relação aos demais microrganismos. Este dado é importante para se estabelecer um menor tempo de cultivo dos microrganismos que apresentaram maior velocidade de crescimento radial. Os meios de cultivo ágar Sabouraud e PDA são amplamente citados na literatura como eficientes na seleção e cultivo de diferentes fungos filamentosos (MACHADO et al., 2001; DONINI et al., 2005; OSTROSKY et al., 2008; FASANELLA, 2008; RODRIGUES, 2009; BARBOSA et al., 2010; ROVEDA, HEMKEMEIER e COLLA,

2010). Ao estudar a influência da temperatura no crescimento radial de *Rhizopus*, SOCCOL (1992) obteve maior velocidade de crescimento a temperatura de 30°C após testar as seguintes temperaturas (22°C, 25°C, 30°C, 36°C e 41°C).

A seleção de cepas produtoras de enzimas é uma técnica de grande importância, principalmente em países que apresentam uma grande biodiversidade como o Brasil, o que justifica a busca de fontes alternativas de cepas fúngicas (ROVEDA; HEMKEMEIER; COLLA, 2010).

3.2 SELEÇÃO QUANTITATIVA DE CEPAS PRODUTORAS DE α -AMILASE POR FSm

Testes de produção de amilases por FSm em frascos de Erlenmeyer foram realizados com o intuito de avaliar quais cepas, dentre as pré-selecionadas a partir do crescimento radial, são maiores produtoras da enzima, e definir uma delas para a continuidade do trabalho de pesquisa.

As fermentações foram conduzidas em frascos de Erlenmeyer incubados em shaker a 29°C por 120 horas, com pH inicial de 6,2. Posteriormente, foram feitas as determinações de atividade de α -amilase conforme apresentado no subitem (2.1.5). Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da produção de α -amilase.

TABELA 2.4 - SELEÇÃO QUANTITATIVA DE CEPAS PARA A PRODUÇÃO DE α -AMILASE

Cepas LPB	Atividade amilásica (U.mL⁻¹)
<i>Aspergillus oryzae</i> LPB 5593	199,31
<i>Aspergillus oryzae</i> LPB 2217	81,303
<i>Aspergillus niger</i> LPB IZ9	75,84
<i>Aspergillus niger</i> LPB 28	82,39
<i>Aspergillus niger</i> LPB W12	78,57
<i>Rhizopus</i> sp LPB 395	70,37
<i>Aspergillus oryzae</i> LPB 2220	61,91
<i>Rhizopus</i> sp LPB 3562	79,11
<i>Rhizopus</i> sp LPB 25976	79,93
<i>Rhizopus</i> sp LPB 28168	63,92
<i>Rhizopus</i> sp LPB 28627	42,15

A cepa de *Aspergillus oryzae* LPB 5593 apresentou atividade de α -amilase de 199,31 U.mL⁻¹ e a cepa *Aspergillus niger* LPB 28 produziu uma atividade de α -amilase de 82,40 U.mL⁻¹.

3.3 ETAPAS DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR *ASPERGILLUS oryzae* LPB 5593

A cepa *Aspergillus oryzae* LPB5593 foi selecionada nas etapas anteriores como melhor produtora da enzima α -amilase.

3.3.1 Estudo da influência de diferentes concentrações de amido sobre a atividade de α -amilase

O meio sintético à base de amido de milho foi usado como meio de produção de α -amilase em FSm conforme item 2.3.1 para o teste de diferentes concentrações de amido. Os resultados estão apresentados na Figura 2.7. Analisando o efeito de diferentes concentrações de amido sobre a produção de α -amilase, verifica-se que a atividade amilásica mostrou-se 57% superior para fermentações utilizando 2.5% de amido como substrato representando atividade amilásica de 704 U.mL⁻¹ no tempo 48 horas, em comparação com o segundo melhor resultado utilizando 3% de amido onde a atividade amilásica registrada foi de 404 U.mL⁻¹, podendo ser atribuído a viscosidade do meio em função da maior concentração de substrato o que pode ter inibido a produção da enzima.

Amidos e outros substratos amiláceos foram descritos como mais adequados para altas produtividades de amilases (ALI; HOSSAIN, 1991; GOSH; CHATTERJEE; DAS, 1991; KILIKIAN, 1996).

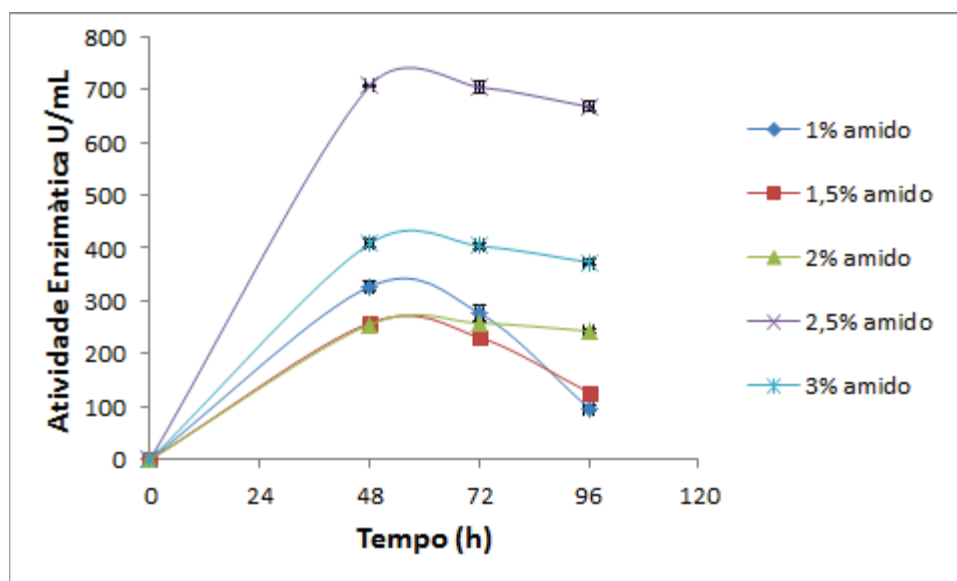


FIGURA 2.7 - UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES PERCENTUAIS DE AMIDO (1%, 1.5%, 2%, 2.5% E 3%) PARA PRODUÇÃO DE AMILASE

A síntese de amilases em meios de cultivo contendo amido como fonte de carbono tem sido descrita por vários autores: Agrawal et al., 2005 (65,23 U.mL⁻¹); Cherry; Hussain; Anwar, 2004 (23,44 U.mL⁻¹); Tanyildizi; Özer; Elibol, 2005 (15,92 UI); Dey et al., 2015 (627,5 U.mg⁻¹); Shafaat et al., 2011 (236U.mL⁻¹); LIU et al., 2008 (53 U.mL⁻¹); Kammoun et al., 2008 (157 U.mL⁻¹).

A Figura 2.8 apresenta os valores encontrados de produção de amilase para as diferentes fontes de nitrogênio avaliadas. Para tanto foram feitos experimentos considerando ausência e presença em comparação com o meio contendo sulfato de amônio, uréia e peptona. Segundo Gupta et al. (2003), fontes de nitrogênio orgânico são preferidas para a produção de α -amilase por bactérias. Em contrapartida, vários sais inorgânicos tais como sulfato de amônio e nitrato de amônio têm sido relatado para melhor produção de α -amilase por fungos.

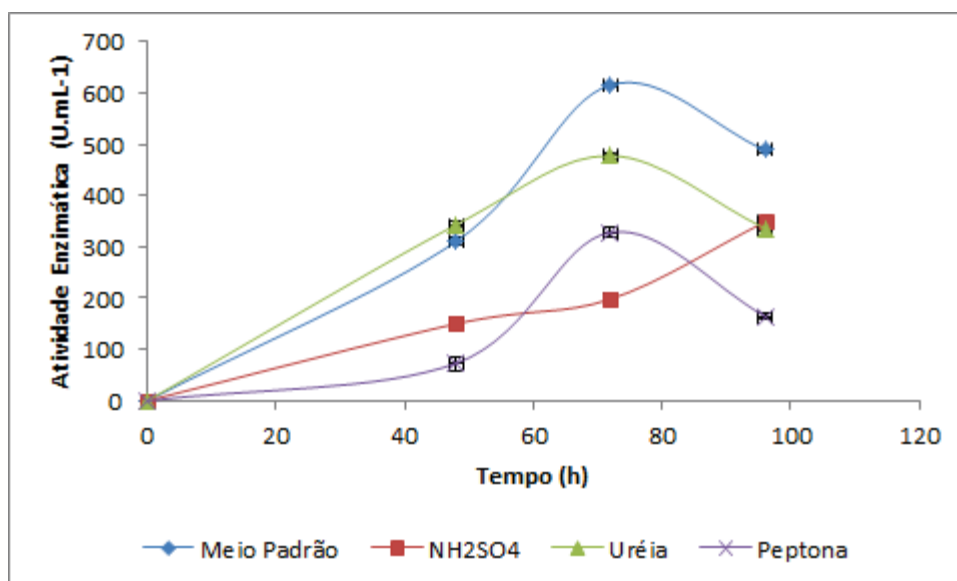


FIGURA 2.8 - OTIMIZAÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO EM MEIO PADRÃO, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, UREIA E PEPTONA PARA PRODUÇÃO DE α -AMILASE

Quando testadas individualmente as fontes de nitrogênio peptona e sulfato de amônia não favoreceram as atividades enzimáticas, sendo os valores de atividade amilásica de 327 U.mL^{-1} e 331 U.mL^{-1} respectivamente. Os demais experimentos atingiram valores superiores, sendo 481 U.mL^{-1} para meio com utilização de uréia e 616 U.mL^{-1} para o meio contendo sulfato de amônio, uréia e peptona.

Os resultados deste experimento mostram que as fontes de nitrogênio influenciam positivamente a produção da α -amilase quando utilizadas conjuntamente, propiciando uma relação C/N e composição do meio favoráveis para o crescimento do fungo e síntese enzimática.

3.3.2 Influência de diferentes concentrações de fonte de carbono e nitrogênio sobre a atividade de α -amilase

A fim de otimizar o processo de produção de α -amilase, as fontes de carbono e nitrogênio foram testadas com o suporte de um planejamento experimental do tipo DCCR do tipo 2^4 com 6 pontos centrais totalizando 30 experimentos. Nesta etapa, apenas as fontes de carbono e nitrogênio foram variadas e os demais nutrientes que compõem a solução nutritiva (item 2.1.1) não foram alterados.

Os resultados do DCCR estão apresentados na Tabela 2.5. As respostas das atividades enzimáticas variaram de 106 U.mL^{-1} a 1005 U.mL^{-1} . A menor atividade foi obtida no ensaio 14, com 35 g.L^{-1} de substrato amido e o melhor resultado foi obtido no ensaio número 20, com 25 g.L^{-1} de substrato amido em 72 horas de fermentação.

TABELA 2.5 - RESULTADOS DO PLANEJAMENTO DCCR PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DAS FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE AMILASE POR FSm.

Ensaio	Variáveis independentes g.L ⁻¹				Atividade amilásica
	Amido	(NH ₄) ₂ SO ₄	Uréia	Peptona	U.mL ⁻¹
1	15,0	1,4	0,5	1,0	512
2	15,0	1,4	0,5	3,0	490
3	15,0	1,4	1,5	1,0	777
4	15,0	1,4	1,5	3,0	409
5	15,0	4,2	0,5	1,0	495
6	15,0	4,2	0,5	3,0	456
7	15,0	4,2	1,5	1,0	465
8	15,0	4,2	1,5	3,0	546
9	35,0	1,4	0,5	1,0	342
10	35,0	1,4	0,5	3,0	372
11	35,0	1,4	1,5	1,0	565
12	35,0	1,4	1,5	3,0	424
13	35,0	4,2	0,5	1,0	251
14	35,0	4,2	0,5	3,0	106
15	35,0	4,2	1,5	1,0	404
16	35,0	4,2	1,5	3,0	574
17	5,0	2,8	1,0	2,0	566
18	45,0	2,8	1,0	2,0	370
19	25,0	0,0	1,0	2,0	846
20	25,0	5,6	1,0	2,0	1005
21	25,0	2,8	0,0	2,0	253
22	25,0	2,8	2,0	2,0	614
23	25,0	2,8	1,0	0,0	320
24	25,0	2,8	1,0	4,0	478
25 (C)	25,0	2,8	1,0	2,0	460
26 (C)	25,0	2,8	1,0	2,0	373
27 (C)	25,0	2,8	1,0	2,0	561
28 (C)	25,0	2,8	1,0	2,0	510
29 (C)	25,0	2,8	1,0	2,0	513
30 (C)	25,0	2,8	1,0	2,0	639

O gráfico de Pareto mostra o efeitos das variáveis testadas. As fontes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e ureia foram significativas ($p < 0,05$) favorecendo a atividade amilásica em níveis mais altos. O amido também teve efeito significativo, porém níveis mais baixos favorecem a atividade da enzima. Tal fato demonstra que uma relação C/N mais equilibrada favorece a produção da enzima. Em estado bruto, os dados analisados alcançaram R^2 0,72, porém o valor foi diminuído devido à exclusão das interações entre os fatores, as quais não foram significativas.

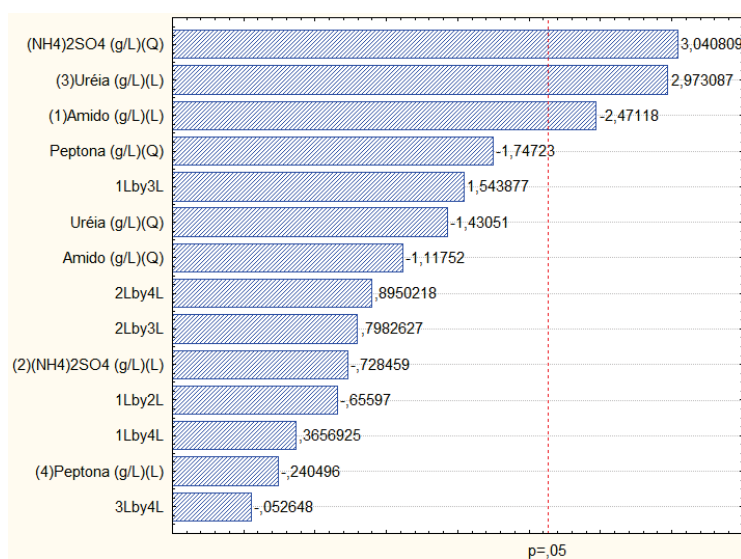


FIGURA 2.8. GRÁFICO DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS DAS VARIÁVEIS TESTADAS SOBRE A PRODUÇÃO DE α -AMILASE

A Figura 2.9 apresenta a superfície de resposta mostrando os resultados da influência das concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e do amido na produção de α -amilase. A tendência mostra que a maior produção de α -amilase foi alcançada em concentrações baixas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sendo que a concentração do amido neste caso não é significativa. Valores intermediários mostram menores produções de amilases.

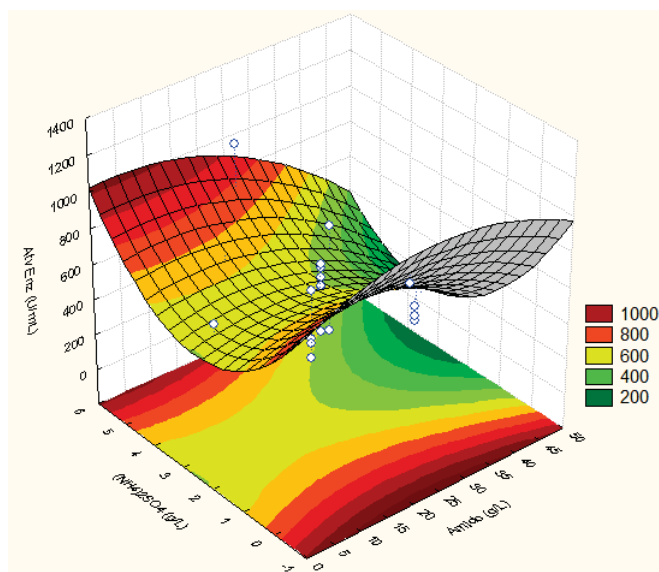


FIGURA 2.9. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO DA PRODUÇÃO DE α -AMILASE MOSTRANDO A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ E AMIDO

A superfície de resposta apresentada na Figura 2.10 mostra os resultados da influência de diferentes concentrações de uréia e amido na produção de α -amilase. A maior produção de α -amilase foi alcançada com concentrações intermediárias de uréia, próximas a 1 g.L^{-1} , e mais baixas concentrações de amido, o que corrobora com o melhor resultado obtido no ensaio número 20 conforme Tabela 2.6.

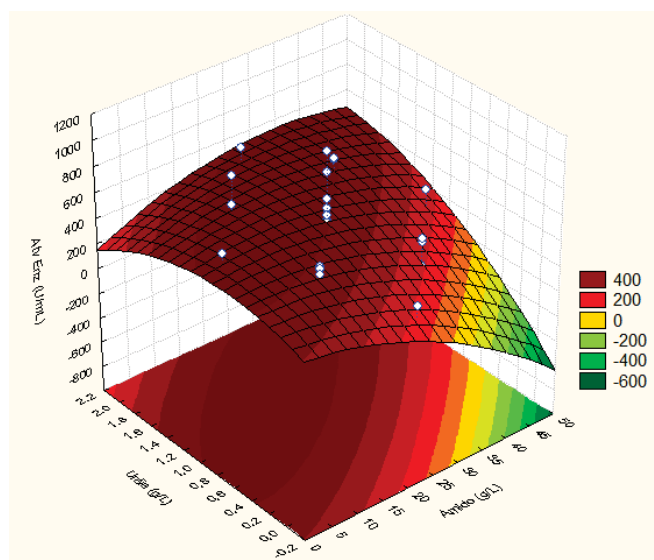


FIGURA 2.10. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE URÉIA E AMIDO SOBRE A PRODUÇÃO DE α -AMILASE

Os resultados obtidos para o efeito da concentração de peptona sobre a produção de amilase não foram significativos segundo o Diagrama de Pareto apresentado na Figura 2.8, ($p > 0,05$). A superfície de resposta apresentada na Figura 2.11 mostra que concentrações próximas a 2 g.L^{-1} levam a maiores produções de α -amilase com concentrações de substrato próximas a 1% (10 g/L).

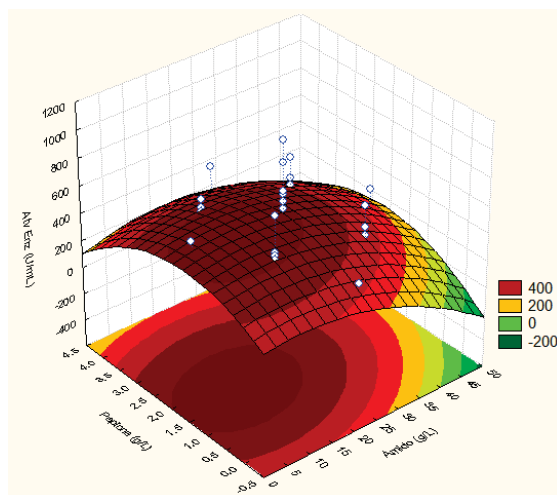


FIGURA 2.11. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PEPTONA E AMIDO SOBRE A PRODUÇÃO DE α -AMILASE

A melhor composição do meio otimizado para a produção de α -amilase em FSm por *Aspergillus oryzae* LPB 5593 foi (g.L^{-1}): amido 2,5; KH_2PO_4 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,56; CaCl_2 0,03; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03; ureia 1; peptona 2. A atividade enzimática obtida foi de 1005 U.mL^{-1} .

3.3.3 Cinética da produção de α -amilase em frascos de Erlenmeyer

A fim de determinar o tempo para a máxima produção de α -amilase, considerando as condições determinadas no processo de otimização das fontes de carbono e nitrogênio, foi realizado um estudo cinético em frascos de Erlenmeyer de 250 mL durante 120 horas, com análises a cada 24 horas, conforme Figura 2.12.

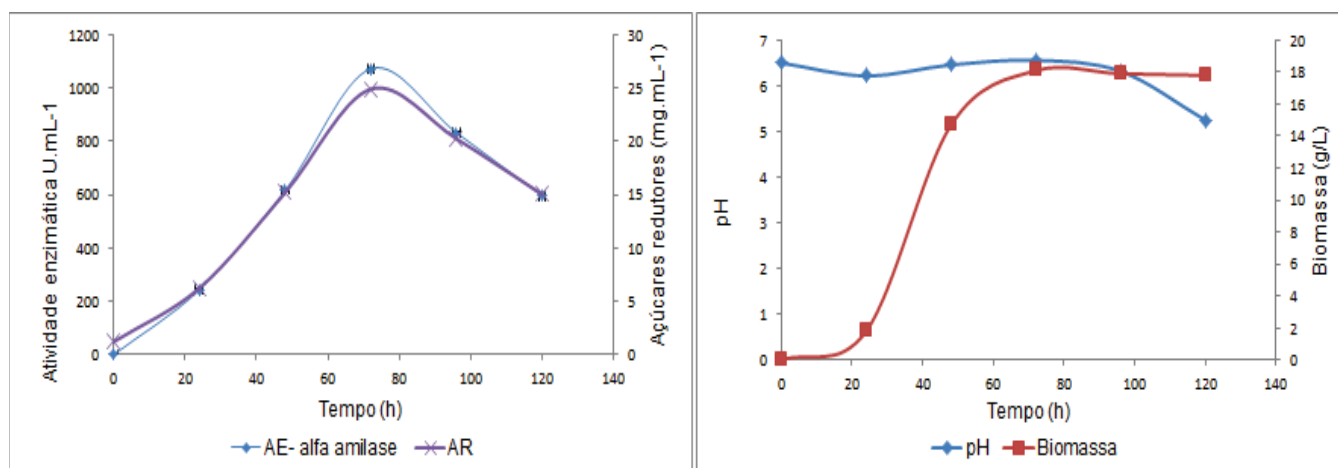


FIGURA 2.12. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM FRASCOS ERLLENMEYER POR *Aspergillus oryzae* LPB 5593. (AE: atividade enzimática da α -amilase, AR: açúcares redutores)

A máxima produção de α -amilase ocorreu em 72 horas de fermentação atingindo 1072 U.mL⁻¹. A biomassa formada foi de 18,1 g.L⁻¹. O pH do meio fermentado oscilou entre 6,25 e 6,56. Hernandez et al., (2005) alcançaram máxima produção de amilase 70,22 U.mL⁻¹ a pH 4,95. A variação de pH entre 5 e 6 favorece a produção de α -amilase em até 21% (DJEKRIF-DAKHMOUCHE et al., 2005). A composição do meio utilizada em (g.L⁻¹) foi: amido 2,5; KH₂PO₄ 0,2; (NH₄)₂SO₄ 0,56; CaCl₂ 0,03; MgSO₄·7H₂O 0,03; ureia 1; peptona 2, apresentou resultados superiores aos reportados por alguns autores. Estudos feitos por Amid et al., (2014) mostram máxima atividade de 466,6 U.mL⁻¹ a pH 5. Wang et al. (2008) obtiveram atividade enzimática de 126 U.mL⁻¹ utilizando meio composto por substrato 1%, (NH₄)₂SO₄ 0,4%, KH₂PO₄ 0,2%, MgSO₄ 0,1%, FeSO₄·7H₂O 0,01% e CaCl₂ 0,0,1%. Utilizando amido como substrato em meio de composição (g/L): KH₂PO₄ 1,0, Na₂HPO₄·2H₂O 3,13, peptona 2,0, (NH₄)₂SO₄ 2,0, MgSO₄·7H₂O 0,05, CaCl₂·2H₂O 0,05, amido solúvel 1,0 (pH 7,0), Afrisham et al. (2016) atribuíram melhores resultados à presença de amônio e cloreto de cálcio e alcançaram atividade enzimática de 329 U.mL⁻¹.

3.4 PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR FSm EM BIORREATOR DE BANCADA

3.4.1 Produção de α -amilase por FSm em biorreator do tipo Tanque Agitado ou Stirred Tank Reactor (STR)

Após as etapas de otimização das condições de produção de α -amilase por FSm em frascos de Erlenmeyer, iniciou-se o estudo em biorreator do tipo tanque agitado ou *Stirred Tank Reactor* (STR). Foram avaliadas diferentes condições de agitação (80, 100, 120 e 150 rpm) e aeração (0,5, 1,0, 1,5, 4,0 vvm). A atividade amilásica foi determinada a cada 24 horas e a melhor condição foi registrada na condição R-6 (TABELA 6) com a utilização de 120 rpm e 1vvm, e atividade enzimática de 349 U.mL⁻¹. Ainda, foi possível observar que a agitação, a qual é necessária para promover a devida homogeneização do meio no biorreator, impossibilitou a uniformidade na formação dos pellets, uma vez que a ação mecânica dos impelidores do tipo pás provavelmente restringiu o desenvolvimento do fungo devido à ação de tensões de cisalhamento, o que não ocorria nos frascos de Erlenmeyer.

TABELA 2.6. PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR FSm COM 2,5% (m/v) DE AMIDO EM BIORREATOR DO TIPO STR UTILIZANDO DIFERENTES TAXAS DE AGITAÇÃO E AERAÇÃO

Tempo[h]	R-1		R-2		R-3		R-4		R-5		R-6	
	Atv. Enz.	pH	Atv. Enz.	pH	Atv. Enz.	pH	Atv. Enz.	pH	Atv. Enz.	pH	Atv. Enz.	pH
0	0	6,3	0	6,3	0	6,3	0	6,3	0	6,3	0	6,3
24	37	5,8	117	6,0	62	6,1	135	6,0	112	6	97	6,0
48	104	5,6	153	5,8	180	5,9	196	6,0	124	5,9	227	5,8
72	125	5,4	138	5,6	134	5,8	203	5,9	141	5,7	235	5,8
96	192	5	185	5,4	247	5,7	201	5,7	269	5	349	5,7
120	50	4,9	170	5,2	263	5,7	292	5,4	332	5,2	322	5,2
Rotação (rpm)	150		120		120		80		100		120	
Aeração (vvm)	4		1,5		0,5		1,0		1,0		1,0	

Na Figura 2.13 é possível observar a evolução da produção de α -amilase para os experimentos R1, R2 e R3. Pode-se observar que na condição R1, onde se utilizou maior velocidade de agitação (150 rpm) e também maior taxa de aeração (4 vvm), a produção atingiu 192 U.mL⁻¹ no tempo de 96 horas com produtividade de 2 U.mL⁻¹.h⁻¹, resultado inferior ao observado no experimento R6 onde a produção chegou a 349 U.mL⁻¹, no mesmo tempo de fermentação, ou seja, com produtividades de 3,74 U.mL⁻¹.h⁻¹.

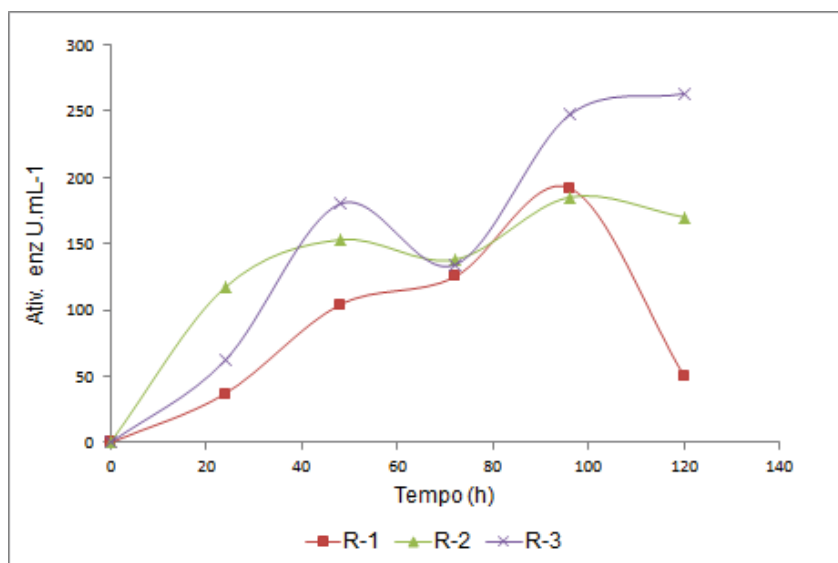


FIGURA 2.13. ESTUDO CINÉTICO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR DO TIPO STR UTILIZANDO DIFERENTES CONDIÇÕES DE AGITAÇÃO E AERAÇÃO.

Nos experimentos R4, R5 e R6 foram utilizadas as mesmas condições de aeração (1vvm), alterando-se as condições de agitação entre 80 e 120 rpm. Os resultados podem ser observados na Figura 2.14.

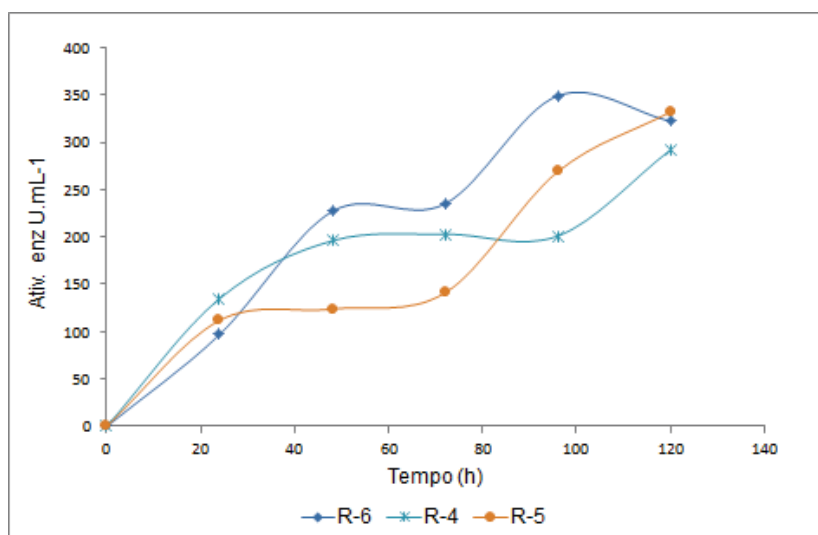


FIGURA 2.14. ESTUDO CINÉTICO DE PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR DO TIPO STR UTILIZANDO DIFERENTES CONDIÇÕES DE AGITAÇÃO E AERAÇÃO.

A produção da enzima foi inferior à máxima alcançada em frascos de Erlenmeyer (1072 U mL^{-1}) e, apesar de biorreatores do tipo STR serem comumente empregados na produção industrial de enzimas, as tensões de cisalhamento geradas podem causar danos às células de fungos filamentosos e considerável redução na produção da enzima (AHAMED; VERMETTE, 2010). O fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* pode ser sensível às tensões de cisalhamento geradas pela agitação mecânica. Segundo Ahamed e Vermette (2010), análises microscópicas revelaram que além de menor produção enzimática (celulases) pelo fungo *Trichoderma reesei* sob agitação mecânica em biorreator do tipo STR, o microrganismo também sofreu comprovado cisalhamento, apontado pela diminuição de hifas miceliais e o aumento de extremidades.

Observou-se ainda que o microrganismo se desenvolve preferencialmente na região próxima às paredes e na parte superior do biorreator, onde houve acúmulo e aderência desencadeadas pela agitação mecânica, produzindo um fermentado de coloração avermelhada (FIGURA 2.15). Tal fato pode demonstrar uma mudança no metabolismo do fungo devido ao stress ocasionado pelas altas taxas de cisalhamento o que contribuiu para a diminuição do pH.



FIGURA 2.15. PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM BIORREATOR DO TIPO STR

3.4.2 Produção de α -amilase por FSm em biorreator do tipo Coluna de Bolhasou Bubble Columnm Reactor (BCR)

Diferentes fermentadores têm sido sugeridos para aumentar ataxa de transferência de oxigênio, limitando atensão de cisalhamento. Este é o casodos biorreatores comagitação pneumática do tipo *Air Lift*ou coluna de bolhas (BCR). (CHISTI, 1989; AHAMED; VERMETTE, 2010).

Considerando que a produtividade em reator do tipo STR não foi significativa, uma vez que o crescimento microbiano eas características do meio foram alteradas, o biorreator do tipo BCR, comagitaçãoopneumática, foi testado como uma alternativa.A Figura 2.16 mostra a produtividade da amilase em biorreator do tipo BCR, utilizando as condições de processo ($T = 29^{\circ}\text{C}$, taxa de inoculação de 10^7 esporos/mL, pH inicial 6,5) e composição de meio de produção otimizada conforme seção 3.3.2.

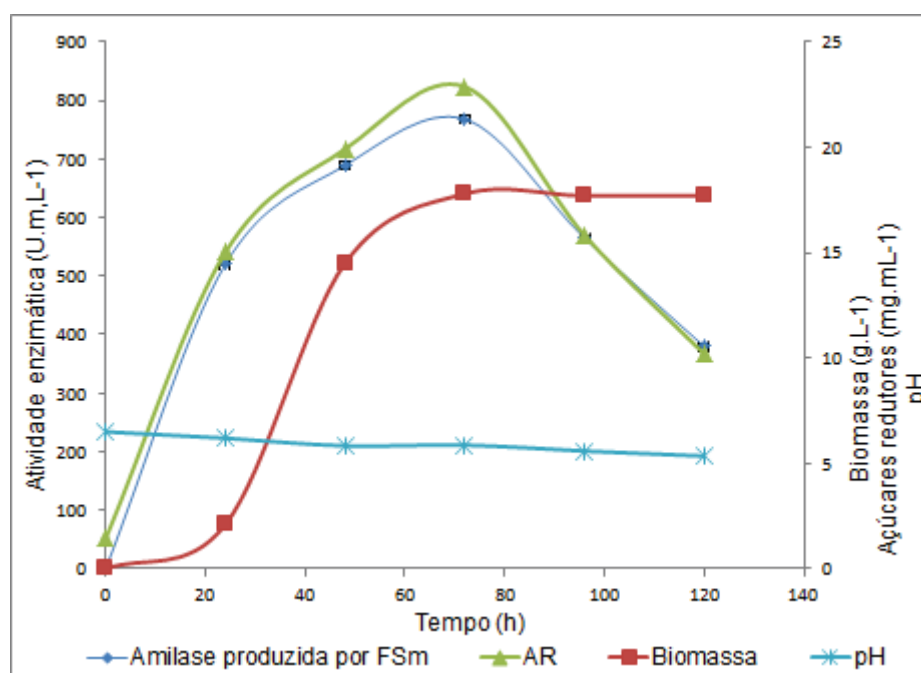


FIGURA 2.16. PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR FSm EM BIORREATOR DO TIPO COLUNA DE BOLHAS (BCR).

O resultado da produção de α -amilase em BCR foi de 768 U.mL^{-1} (Figura 16) com produtividade de $10,66 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$, ou seja, 2,96 vezes superior à obtida em biorreator do tipo STR de 349 U.mL^{-1} (TABELA 2.6). A máxima concentração de açúcares redutores no tempo 72 horas foi de $21,12 \text{ mg.mL}^{-1}$. Estudos feitos por Mitidieri et al. (2006) mostram concentrações de açúcares redutores de 6 mg.mL^{-1} entre 20 e 24 horas de fermentação e atividade amilásica máxima de 18 U.mL^{-1} . O aumento da produtividade pode ser atribuído ao sistema de aeração que propicia interação mais lenta evitando cisalhamento conforme mostrado na Figura 2.17.

Quando comparados aos STRs, os biorreatores com agitação pneumática como os do tipo BCR apresentam menor consumo energético, boa capacidade de homogeneização em meios com sólidos em suspensão, eficiente transferência de massa e calor e padrões de fluxo melhor definidos (PETERSEN; MAGARITIS, 2001; LUO; AL-DAHAN, 2008).



FIGURA 2.17. PRODUÇÃO DE α -AMILASE POR FSm UTILIZANDO MEIO SINTÉTICO AMIDO (2,5%, m/v) E *A. oryzae* LPB 5593 EM BIORREATOR BCR

Os biorreatores do tipo STR e BCR utilizados para esse estudo apresentam diferentes perfis de agitação e aeração. Os resultados obtidos para o fermentador do tipo BCR apresentam vantagem significativa quanto à movimentação das partículas e formação homogênea dos pellets formados pelo fungo. Ainda, por tratar-se de fermentação submersa, a viscosidade observada do caldo fermentado facilitou o processo de amostragem.

3.5 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE α -AMILASE POR MICRO E ULTRAFILTRAÇÃO EM SISTEMA PELLICON II

O sistema de separação por membranas de microfiltração e ultrafiltração Pellicon II da Millipore é um equipamento de bancada que permite a separação de maiores volumes de amostra. De forma tangencial a amostra é impulsionada por uma bomba peristáltica fluindo através de membranas planas obtendo-se uma fração retida e uma fração permeada composta de moléculas maiores e menores, respectivamente, do que o tamanho de corte da membrana.

O extrato bruto foi submetido primeiramente a uma microfiltração em membrana de 0,45 μm e a fração permeada foi submetida a ultrafiltração em membrana de 30 kDa. Autores relatam massa molar para amilases acima de 42 kDa. MORAES et al., (1999) registraram massa molar de 150 kDa para α -amilase de *Bacillus subtilis*. Amilases de *H. turkmenica* (DSM-5511) foram obtidas por SANTORELLI et al., (2016) com massa molar entre 54 kDa e 66 kDa.

A sequência de operações e taxas de recuperação são demonstradas na Tabela 2.7. A atividade amilolítica foi concentrada após ultrafiltração do extrato enzimático em membrana de 30 kDa. A taxa de recuperação foi de 118,34% do total de atividade de entrada, ou seja, a fração permeada com massas molares inferiores a 30 kDa registrou uma concentração do extrato enzimático de 1,48 vezes em relação à atividade de amilase.

Este sistema de separação e concentração de biomoléculas mostrou-se bastante eficiente para as α -amilases produzidas, pois podem ocorrer perdas nos processos de purificação de enzimas (DAKO et al., 2012). Resultados de análises obtidos após as etapas de purificação para enzima celulase mostram diminuição na

atividade enzimática em torno de 50 a 70% segundo Sá-Pereira et al. (2003). O método utilizado pode ser aplicado em escala industrial.

TABELA 2.7. OPERAÇÕES DE SEPARAÇÃO/PURIFICAÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO EM SISTEMA PELLICON II

Fração	Etapa	Atividade Enzimática U/mL.	Proteína mg/mL.	Atividade Específica U/mg	Taxa de Recuperação (%)	Taxa de purificação
Ext. Bruto		768	1,03	746,8	100	1
0,45µm	Permeado	774	1,12	691,1	123,7	0,96
30 kDa	Retido	1200	1,23	976,48	114,8	1,41

3.6 ELETROFORESE SDS-PAGE

Para análise em SDS-PAGE os grupos 1: retido 100 kDa, 2: permeado 100 kDa, 3: retido de 10 kDa, 4: permeado de 30 kDa e 5 e 6: retido membrana 30 kDa, provenientes do processo de separação por membranas foram resuspendidos em 1 mL de tampão fosfato para aplicação em gel de poliacrilamida. Na Figura 2.19 é possível observar o perfil proteico das diferentes frações de separação por membrana, mostrando claramente a presença de uma banda fortemente azulada em torno de 30 kDa nos poços 6 e 7. Os demais poços não apresentaram bandas proteicas evidentes embora apresentassem alta D.O (densidade ótica).

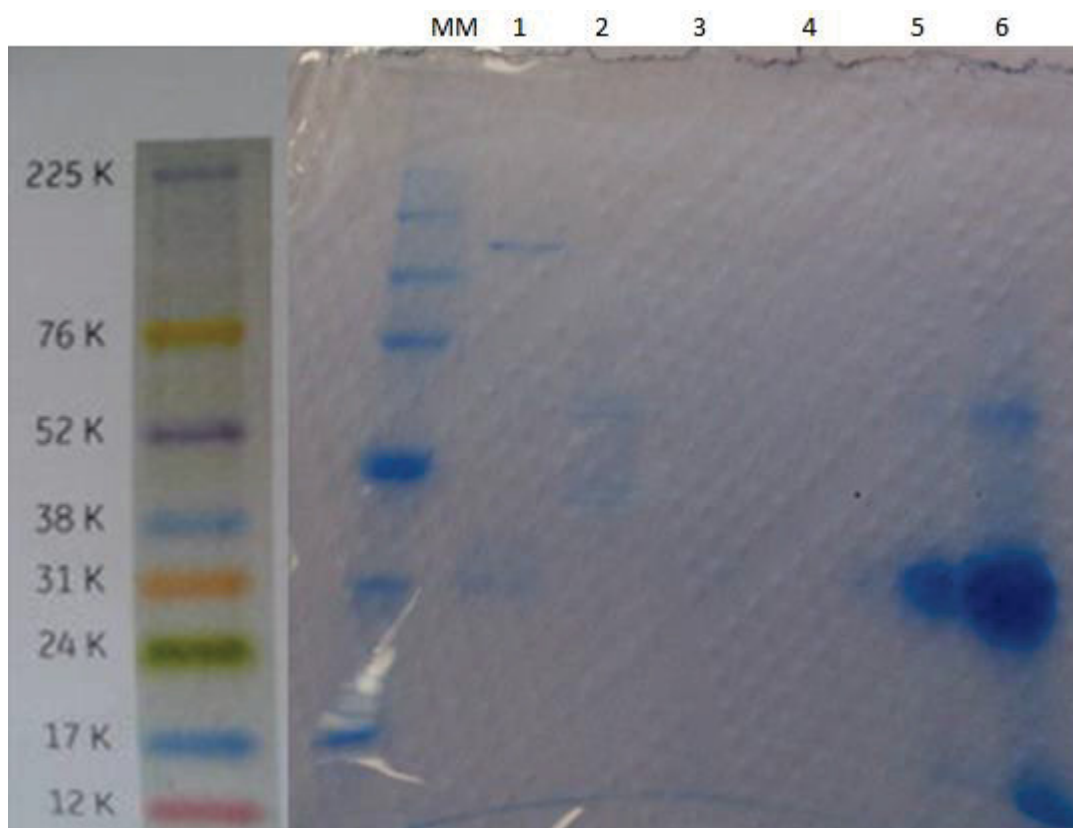


FIGURA 2.19. ELETROFORESE DAS FRAÇÕES OBTIDAS NO PROCESSO DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO. MM: CORRESPONDENTE AO MARCADOR MOLECULAR; 1: RETIDO 100 kDa; 2: PERMEADO 100 kDa; 3: RETIDO DE 10 kDa; 4: PERMEADO DE 30 kDa E 5 E 6: RETIDO MEMBRANA 30 kDa.

4 CONCLUSÕES

Um bioprocesso para a produção e separação de α -amilase foi desenvolvido com o fungo selecionado *Aspergillus oryzae* LPB 5593 em fermentação submersa. Estudos de otimização do processo de produção mostraram a significância das fontes de nitrogênio e de amidos seguintes condições: amido solúvel 2,5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,56%, ureia 1% e peptona 2%(m/v). Desde a etapa de seleção até o final da otimização, a atividade de amilase passou de 228 U.mL^{-1} para 768 U.mL^{-1} , representando um aumento de 336,84%.

A utilização de biorreatores para escalonar a produção da enzima se mostrou eficiente, sendo que o modelo BCR apresentou melhor desempenho em relação ao STR para o fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* LPB 5593. A aeração pneumática

do BCR promoveu a homogeneização do meio sem oferecer riscos relacionados ao colapso do micélio fúngico, chegando-se a uma produção de enzima de 768 U.mL⁻¹ e produtividade de 10,66 U.mL⁻¹.h⁻¹. O extrato enzimático bruto foi então separado e purificado em sistema de membranas de microfiltração (0,45 µm) seguido de ultrafiltração em membrana de 30 kDa. A taxa de recuperação foi de 114,8 %, chegando-se a um extrato contendo amilase com 1200 U.mL⁻¹. A eletroforese SDS-PAGE possibilitou a determinação da massa molecular da enzima produzida como sendo um pouco superior a 30 kDa.

5 REFERÊNCIAS

ANURADHA GHOSH, BANHISIKHA CHATTERJEE, ARATI DAS. Purification and characterization of glucoamylase of *Aspergillus terreus* NA-170. **Mutant**. Vol.71, (1991), p.162–169

AFTAB AHAMED, PATRICK VERMETTE. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. Volume 49, Issue 3, 15 May 2010, Pages 379–387.

ARCHANA SHARMA, T. SATYANARAYANA., 2013. Structural and biochemical features of acidic α -amylase of *Bacillus acidicola*. **International Journal of Biological Macromolecules** 61 (2013) 416– 423.

ARTI GUPTA, NEELAM GAUTAM AND DINESH RAJ MODI. Optimization of α -amylase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research** Vol. 1(1). pp. 001-008 (2010).

ADRIE J J STRAATHOF. The Proportion of Downstream Costs in Fermentative Production Processes. **Comprehensive Biotechnology**, Second Edition, Chapter: 2.57, Publisher: Elsevier, Editors: Murray Moo-Young, pp.811-814

B.K. LONSANE.M.V. RAMESH. Production of Bacterial Thermostable α -Amylase by Solid-State Fermentation: A Potential Tool for Achieving Economy in Enzyme Production and Starch Hydrolysis. **Advances in Applied Microbiology**. Volume 35, 1990, Pages 1-56.

BARBOSA, A. S. et al. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, n. 1, p. 63-79, jan./mar. 2010.

CASSANO, A.; DRIOLI, E.; GALALAVERNA, G.; MARCHELLI, R.; DI SILVESTRO, R.; CAGNASSO, P. (2003), Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes. **Journal of Food Engineering**, **57**, 153-163.

DAKO, E., BERNIER, A.M., DADIE. A.T., JANKOWSKI, K., 2012. The problems associated with enzymes purification. In: Ekinici, D. (Ed.), **Chemical Biology** 444p.

ELIANA DE OLIVEIRA SANTOS; MEIRE LELIS LEAL MARTINS. Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp. **Braz. arch. biol. technol.** vol.46 no.1 Curitiba Jan. 2003

ERIN E. PETERSEN AND ARGYRIOS MARGARITIS. (2001) Hydrodynamic and Mass Transfer Characteristics of Three-Phase Gaslift Bioreactor Systems. **Critical Reviews In Biotechnology** Vol. 21.

FASANELLA, C. C. Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente. 2008. 80 f. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba.**

GOPAL K. CHOTANI, TIMOTHY C. DODGE, ALFRED L. GAERTNER AND MICHAEL V. ARBIGE. Industrial Biotechnology: **Discovery to Delivery**. 2007, XIV, 1875p. 100 illus., Hardcover.

GUPTA, R; GIGRAS, P; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry** 38 (2003) 1599?/1616.

HASHEMI, M., RAZAVI, S. H., SHOJAOSADATI, S. A., MOUSAVI, S. M., KHAJEH, K., SAFARI, M. Development of a solid-state fermentation process for production of an α amylase with potentially interesting properties. **Journal of Bioscience and Bioengineering** vol. 110 no. 3, 333–337, 2010.

HOWELL, J. A.; SANCHEZ, V.; FIELD, R. W. (1993), *Membranes in bioprocessing: theory and applications*. **1st edition, Chapman and Hall.**

HM CHERRY, T HUSSAIN, MN ANWAR. Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*. **Pak. J. Biol. Sci**, 2004.

HABERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. Processos de separação por membranas. **Rio de Janeiro: E-pappers**, 2006.

JOO, H.S., CHANG, C.S., 2005. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochem.** 40, 1263–1270.

KILIKIAN, BEATRIZ VAHAN. Production of glucoamylase by fed-batch culture of *Aspergillus awamori* NRRL3112. **Rev. Microbiologia**; 27(2):137-141 (1996).

LUO, H.P.; AL-DAHMAN, M.H. Macro-mixing in draft-tube airlift bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 63, p. 1572-1585, 2008.

L.P. DONINI, E. BERNARDI, E. MINOTTO, J.S. DO NASCIMENTO. Desenvolvimento in vitro de *Pleurotus* spp. Sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v.72, n.3, p.331-338, jul./set., 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MACHADO, C. M. M. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – ga3) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: relação da produção de ga3 em biorreator piloto e

bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná**, 2002. 95 p

MACHADO CM, SOCCOL CR, DE OLIVEIRA BH, PANDEY A (2002) Giberellic acid production by solid-state fermentation in coffee husk. **Appl Biochem Biotechnol** 102–103:179–191.

MABEL SALAS HERNÁNDEZ, MARILÚ RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, NELSON PÉREZ GUERRA, RENATO PÉREZ. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. **Journal of Food Engineering**. Volume 73, Issue 1, March 2006, Pages 93–100.

MARCO SANTORELLI, LUISA MAURELLI, GABRIELLA POCSFALVI, IMMACOLATA FIUME, GIUSEPPE SQUILLACI, FRANCESCO LA CARA, GIOVANNI DEL MONACO, ALESSANDRA MORANA. Isolation and characterization of a novel alpha-amylase from the extreme haloarchaeon *Haloterrigena Turkmenica*. **International Journal of Biological Macromolecules** 92 (2016) 174–184.

MEHRNOUSH AMID, MOHD YAZID ABD MANAP. Purification and characterisation of a novel amylase enzyme from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. **Food Chemistry**. Volume 165, 15 December 2014, Pages 412–418.

MORAES, L.M.P.; FILHO, S.A.; ULHOA, C.J. (1999). Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 15, 561-564.

M. SABAN TANYILDIZI, DURSUN ÖZER, MURAT ELIBOL. Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. **Process Biochemistry**. Volume 40, Issue 7, June 2005, Pages 2291–2296.

NAJAFPOUR, G.D Biochemical Engineering and biotechnology. **1 ed. Amsterdam: Elsevier B.V**, 2007, 421p

OSTROSKY, E. A. ET AL. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória CMI de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301-307, mar. 2008.

OLIVEIRA, J. Produção de ácido giberélico por fermentação submersa e por fermentação no estado semissólido em diferentes modelos de biorreatores utilizando polpa cítrica. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Federal do Paraná**, 2012. 129 p.

PETERSEN, E.; MARGARITIS, A. Hydrodynamic and mass transfer characteristics of three-phase gaslift bioreactor systems. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 21, p. 233-294, 2001.

POLIZELI ML, RIZZATTI AC, MONTI R, TERENCE HF, JORGE JA, AMORIM DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2005 Jun;67(5):577-91.

POLIEZI M.L.T.M., RIZZATTI A.C.S., MONTI R., TRENZI H.F., JORGE J.A., AMORIN D.S. (2005). Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 67: 557-591.

PANDEY, A; SOCCOL, C.R; RODRIGUEZ-LEON, J.A; NIGAM, P. Solid-State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications, **Asiatec Publishers Inc, New Delhi**, 2001, 221p.

QUNHUI WANG, XIAOQIANG WANGA, XUMING WANGC, HONGZHI MA. Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. **Process Biochemistry** 43 (2008) 280–286

RODRIGUES, A. A. Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats. 2009. **Dissertação (Mestrado em Concentração de Microbiologia)–Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia**, 2009.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 30, p. 126-131, jan./mar. 2010.

RAJENDRA KUMAR SAXENA, KAKOLI DUTT, LATA AGARWAL, PREETI NAYYAR. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. **Bioresource Technology** Volume 98, Issue 2, January 2007, Pages 260–26.

RADHOUANE KAMMOUN, BELGACEM NAILI, SAMIR BEJAR. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology** 99 (2008) 5602–5609.

SAIDEHA FRISHAM, ARASTOO BADOEI-DALFARD, ABDOLHAMID NAMAKI-SHOUSHTARI, ZAHRA KARAMI. Characterization of a thermostable, CaCl_2 -activated and raw-starch hydrolyzing α -amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid state fermentation by utilizing agricultural wastes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 132(2016)98–106.

SÁ-PEREIRA, P.; PAVEIA, H.; COSTA-FERREIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. A new look at xylanases: An overview of purification strategies. **Molecular Biotechnology**, v. 24, p. 257-281, 2003.

S. DJEKRIFF-DAKHMOUCHE, Z. GHERIBI-AOULMI, Z. MERAIHI, L. BENNAMOUM. Application of a statistical design to the optimization of culture

medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Engineering**. Volume 73, Issue 2, March 2006, Pages 190–197.

S. SHAFAT, M. AKRAM AND A. REHMAN. Isolation and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus subtilis*., **African Journal of Microbiology Research** Vol. 5(20), pp. 3334-3338, 30 September, 2011.

Socol, C.R. (1992). Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée, en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L(+) lactique. **PhD Thesis, Université Technologique de Compiègne, France**, pp. 219.

S. ALI, Z. HOSSAIN. Characteristics of glucoamylase from *Aspergillus terreus*. **Applied Microbiology**. Volume 71, (1991). P.144–146

SÁ, I. S; CABRAL, L. M. C.; MATTA, V. M. (2003), Concentration of Pineapple Juice by Membrane Separation Processes. **Brazilian Journal of Food Technology**, 6 (1), 53-62.

STRAATHOF, A.J. J. (2011). The proportion of downstream costs in fermentative production processes. In M. Moo-Young (Ed. in chief), **Comprehensive Biotechnology**, Vol. 2, (2nd ed.) (pp. 811–814). **Oxford: Elsevier**.

SYDNEI MITIDIERI, ANNE HELENE SOUZA MARTINELLIA, AUGUSTO SCHRANKA, MARILENE HENNING VAINSTEIN. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology** 97 (2006) 1217–1224

TAPATI BHANJA DEYN, RINTU BANERJEE - Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103 - **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 4 (2015) 83–90.

XU DONG LIU, YAN XU. A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education and School of Biotechnology, **Southern Yangtze University, Wuxi 214036** (2007).

YUSUF CHISTI, MURRAY MOO-YOUNG. On the calculation of shear rate and apparent viscosity in airlift and bubble column bioreactors. **Biotechnology and bioengineering**. Vol. 34, p.1391-1392 (1989).

YANG CH, LIU WH. Purification and properties of a maltotriose producing α -amylase from *Thermobifida fusca*. **Enzyme Microb Technol** 2004;35:254–60.

XU DONG LIU, YAN XU. A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. **Bioresource Technology**. Volume 99, Issue 10, July 2008, Pages 4315–4320.

CAPÍTULO III –ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE FORMULAÇÃO LÍQUIDA E EM PÓ DE α -AMILASE PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

As biomoléculas prospectadas e estudadas para aplicação em larga escala devem alcançar, além dos desempenhos satisfatórios em escala laboratorial, capacidade de manutenção de suas atividades biológicas após a recuperação. Estudos de estabilidade da α -amilase produzida por FSm em meio sintético à base de amido foram realizados para a obtenção de formulação líquida e em pó. Aditivos e adjuvantes, normalmente empregados para a formulações enzimáticas, foram avaliados. Dentre os diversos aditivos, o ácido benzóico, polietilenoglicol (PEG) e sorbitol, adicionados ao extrato líquido pré-purificado em membranas, foram os melhores na preservação da atividade amilásica a 37°C por 15 dias (sob condições aceleradas). A partir de delineamentos experimentais foram estabelecidas as concentrações dos aditivos: ácido benzóico a 0,05% (m/v), PEG a 1% (m/v) e sorbitol a 2,50% (m/v), como melhor condição para preservação da atividade enzimática. No estudo de estabilidade de longo prazo sob refrigeração, com avaliação durante 120 dias, a formulação definida manteve atividade residual da enzima em 72,37% comparadas à atividade inicial da enzima em temperatura ambiente e em 79,43% comparada ao ensaio controle sob refrigeração. A formulação líquida definida foi então empregada nos estudos de secagem em Spray-Dryer com a adição de maltodextrina como agente encapsulante. Agentes encapsulantes como lactose, β -ciclodextrina, manitol, goma arábica, e trealose apresentam atividade enzimática de 63 a 100%. A enzima em pó foi igualmente testada quanto à sua estabilidade, a qual se manteve em 89,99% durante 120 dias. O produto em pó obtido mostrou ótima estabilidade estando pronto para testes de aplicação em panificação.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas e demais produtos de origem biológica requerem cuidados específicos para a manutenção de suas características. Os processos de recuperação e separação dessas biomoléculas podem afetar a estabilidade dos compostos, por causa dos processos seriados (BIAZUS et al., 2010), uso de produtos químicos, estresses mecânicos (centrifugação, agitação), estresse térmico, entre outros. Além disso, quando isolada, a molécula deixa de interagir com diversas estruturas e componentes celulares que podem estar associados à manutenção de suas atividades biológicas (COLACINO e CRICHTON, 1997). Assegurar a estabilidade é o fato de maior importância no sucesso da implantação de um produto de origem biológica (WEIJERS e RIET, 1992).

As estratégias para estabilização de enzimas têm sido temas de diversos trabalhos. Dentre os métodos podem ser citados: a imobilização de enzimas em matrizes sintéticas ou naturais, modificações químicas das moléculas (GULLA et al., 2004), modificações genéticas e associação com aditivos em uma formulação (FU et al., 2010).

O uso de aditivos é uma das formas mais acessíveis e pode prevenir a ação de agentes químicos e biológicos, além de aumentar a resistência das moléculas a altas temperaturas, o principal fator que afeta a estabilidade enzimática (GULLA et al., 2004). Os aditivos são compostos adicionados ao produto de interesse, como sais, aminoácidos, surfactantes, metil ésteres, compostos metálicos, poli hídricos, polieletrólitos, antibióticos, entre outros. Estes agentes têm naturezas químicas diversas e a escolha dos componentes está associada à característica que se deseja atingir. A etapa de pré-seleção fornece abordagem de formulação e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que melhoram a integridade do produto (REYNOLDS et al., 2002). Formulações e preparações enzimáticas são amplamente utilizadas na indústria. O uso de adjuvantes em associação aos extratos enzimáticos é uma técnica que busca além da estabilização das enzimas em reações adversas, aumentar a vida útil do produto.

Exemplos de adjuvantes são: antioxidantes, estabilizantes, antiemectantes, reguladores de acidez, conservantes e sequestrantes (ROWE et al., 2009).

As formulações enzimáticas podem estar na forma líquida ou em pó. As formulações líquidas são preparadas com o extrato enzimático adicionado de aditivos, conforme prevê a Legislação da ANVISA – RCD Nº 53 em seus anexos II e III. Os produtos em pó são formulados com aditivos e agentes encapsulantes, tais como maltodextrinas, dextrinas, ciclodextrinas, carboximetil celulose e outros, e secos em Spray Dryer ou Liofilizador. A secagem por Spray-Drying é uma técnica muito utilizada industrialmente, além de ser mais econômica (MASTERS, 1985; SHAW, 1997; AULTON, 2002)

O estudo da estabilidade de um produto é realizado com a finalidade de garantir, além da ação esperada, também a integridade química, física, microbiológica e toxicológica, dentro dos limites especificados, sob influência dos fatores ambientais em função do tempo (LUCAS; BISHARA; SEEVERS, 2004; ANSEL; POPOVICH; ALEN, 2007).

No estudo de estabilidade acelerada, os aditivos são avaliados quanto à sua capacidade individual de estabilizar a atividade de amilase durante 15 dias. Esta fase permite avaliar tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que melhorarão a integridade do produto (REYNOLDS et al., 2002).

O objetivo deste capítulo foi estudar a nova enzima, produzida em FSm por *Aspergillus oryzae* NRRL 5593 com emprego de meio sintético amido como substrato, quanto à sua estabilidade e o efeito da adição de aditivos no extrato enzimático concentrado. Avaliação do efeito da adição de aditivos na estabilidade de amilase foi realizada, observando-se a ação destes para composição da formulação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS DE α -AMILASE PARA ESTUDOS DE FORMULAÇÃO E ESTABILIDADE

Após otimização da produção da enzima amilase por fermentação submersa, o fermentado foi extraído do biorreator e submetido a filtração em papel filtro Whatman nº 1. O extrato bruto obtido foi microfiltrado em conjunto a vácuo com o emprego de uma membrana de éster de celulose de 0,45 μ m obtendo fração retida e permeada, posteriormente submetido à ultrafiltração em membrana do tipo cassette de 30 kDa do sistema de ultrafiltração Pellicon II (Millipore).

A fração retida, com predominância de α -amilase, foi denominada extrato amilolítico e foi utilizado em todas as etapas do estudo de formulação e estabilidade.

2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE α -AMILASE

A atividade enzimática da α -amilase foi determinada pela incubação de 0,5 mL da enzima diluída adequadamente, com 0,5 mL de amido (Synth) 2% (m/v) em tampão acetato de sódio pH 7 (JENSEN, OLSEN 2003; RAMESH e LONSANE 1989). Após 10 minutos de incubação a 37°C foi adicionado 1,0 mL de DNS e a mistura foi levada à ebulição por 5 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 3,5 mL de água e o conteúdo homogeneizado. Os açúcares redutores foram determinados pelo método DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) (MILLER, 1959).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária para hidrolisar amilase equivalente 1 μ mol de maltose por minuto dentro das condições mencionadas.

2.3 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

Para execução das análises, alíquotas do extrato enzimático bruto de α -amilases foram acondicionadas em frascos com volume de 2 (dois) mL, os quais foram armazenados em diferentes condições: a temperatura ambiente (A), em estufa a 37°C (E) e sob refrigeração 4°C (R). As amostras foram analisadas quanto à atividade enzimática com frequência semanal, totalizando 4 meses ao fim do experimento.

2.4 FORMULAÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO DE α -AMILASES

2.4.1 Seleção de componentes para formulação do extrato enzimático de α -amilase

O estudo de pré-seleção (screening) dos aditivos que favorecem a estabilidade da atividade de amilase foi realizado com base na RESOLUÇÃO CNS/MS N.º 04, DE 24 DE NOVEMBRO DE 1988 da ANVISA, e também com base no documento RDC N.º 53, DE 07 DE OUTUBRO DE 2014, mais especificamente nos anexos II e III que tratam dos veículos e aditivos alimentares que podem ser incorporados às formulações enzimáticas. Foram excluídos aqueles em que havia alguma restrição de aplicação em alimentos segundo a ANVISA.

Foram estudados três grupos de aditivos, sendo cada grupo estudado em duas concentrações dentro da faixa máxima permitida segundo literatura. Os aditivos estão divididos em conservantes e estabilizantes, poliois e aditivos considerados antioxidantes. A composição dos grupos se deu pela similaridade e/ou função desempenhada na formulação, considerando que certos componentes abrangem mais de uma função dentro da classificação como por exemplo os antioxidantes (ANVISA, 1988; 2005; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Para a primeira etapa de estudos de formulação e estabilidade, foi realizado um estudo de atividade acelerada na temperatura ótima de ação enzimática na presença dos diferentes aditivos. Os aditivos foram testados em diferentes concentrações (%), amáxima permitida [2C] pela legislação brasileira e a metade desta quantidade [C]. Os aditivos testados e suas concentrações constam na TABELA 3.1.

TABELA 3.1. ADITIVOS UTILIZADOS NA ETAPA DE PRÉ-SELEÇÃO DE COMPONENTES PARA FORMULAÇÃO DE AMILASES PRODUZIDAS EM FSm POR *Aspergillus oryzae* LPB 5593

ADITIVO	[2C] %	[C] %
Ác. Cítrico (ACC)	0,3	0,15
Ác. Benzoico (ACB)	0,05	0,025
Metabissulfito Na (MBNa)	0,002	0,001
Glicerol (GOL)	5	2,5
Sorbitol (SOL)	5	2,5
Manitol (MOL)	5	2,5
Citrato sódio (CITNa)	0,1	0,05
Polietilenoglicol 400 (PEG)	1	0,5
Xilose (XOSE)	3	3
Sacarose (SOSE)	3	3

Fonte: ANVISA (2014)

O extrato enzimático de α -amilase, adicionado do aditivo estudado, foi preparado conforme item 2.1 em frascos de 2 mL, os quais foram incubados em estufa a $37\pm 2^\circ\text{C}$ durante 15 dias. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e com amostragem semanal a fim de se determinar atividades amilásicas e comparar com a atividade inicial no tempo zero sem aditivos. As dosagens para xilose e sacarose não são quantificadas pela ANVISA, porém estudo feito por Samborska (2007) usou sacarose e xilose para estabilização de α -amilase de *Aspergillus niger*. Xilose e sacarose também foram usadas para estabilização de amilase em dosagem de 3% (MONGA et al., 2011). As análises para determinação da atividade acelerada de α -amilase foram realizadas nos tempos 0, 5, 10 e 15 dias de armazenamento. Os aditivos utilizados para a estabilização da atividade de amilase foram avaliados no

período de 15 dias e, aqueles que promoveram a manutenção de maiores atividades da enzima, foram selecionados para a etapa seguinte.

2.4.2 Avaliação da interação dos componentes da formulação de amilase

Os aditivos selecionados na etapa anterior (ácido benzóico, sorbitol e PEG 400) foram estudados em um delineamento fatorial completo de dois níveis do tipo 2^3 (9 ensaios) e 3 pontos centrais, totalizando 12 ensaios, conforme Tabela 3.2. O software Statistica 5.1 (StatSoft Inc., USA) foi utilizado para analisar os dados experimentais. Os frascos de 2 mL com as amostras formuladas foram incubados a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 15 dias para se determinar a atividade enzimática acelerada e estabilidade da formulação.

TABELA 3.2. NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS PARA A AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE ADITIVOS PARA FORMULAÇÃO DE AMILASE PRODUZIDA EM FSm POR *Aspergillus oryzae* LPB 5593

Variáveis independentes (%)	Símbolo	Níveis		
		-1	0	1
Ácido benzóico	ACB	0	0,05	0,1
Polietilenoglicol	PEG400	0	1	2
Sorbitol	SBT	0	2,5	5

2.4.3 Estudo da estabilidade comparativo entre extrato amilolítico purificado adicionado ou não de aditivos

O extrato enzimático contendo α -amilase pré-purificado em membranas conforme descrito no capítulo 2, sem aditivos (controle) e o extrato enzimático purificado formulado com aditivos em suas concentrações ideais foram testados quanto à atividade enzimática durante 120 dias. As amostras foram mantidas em frascos do tipo âmbar de 2 mL sob-refrigeração (4°C) e a temperatura ambiente. A

atividade enzimática (descrito em 2.2) foi determinada a cada semana durante um período de 120 dias.

2.5 ESTUDOS DE SECAGEM DA ENZIMA AMILASE POR SPRAY-DRYER

O extrato purificado, obtido após a separação e purificação em membranas foi avaliado em relação à manutenção da atividade amilolítica após a secagem em *spray dryer* com adição de aditivos. Um volume de 500 mL de extrato formulado foi adicionado de agente encapsulante maltodextrina, na concentração de 15% (m/v) para posterior secagem.

A secagem foi realizada em um secador laboratorial com sistema de atomização tipo bicos – mini spray dryer – Lab Plant, modelo SD-05(Huddersfield, U.K.), com bico injetor de 0,5 mm de diâmetro, vazão de ar de $60 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ e pressão do ar de 0,03 MPa. A alimentação do secador foi realizada por meio de uma bomba peristáltica, com vazão volumétrica em $7 \pm 1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, a temperatura de entrada do ar foi $150 \pm 2^\circ\text{C}$ e temperatura de saída de $75 \pm 2^\circ\text{C}$. O esquema de secagem está apresentado na Figura 3.1.

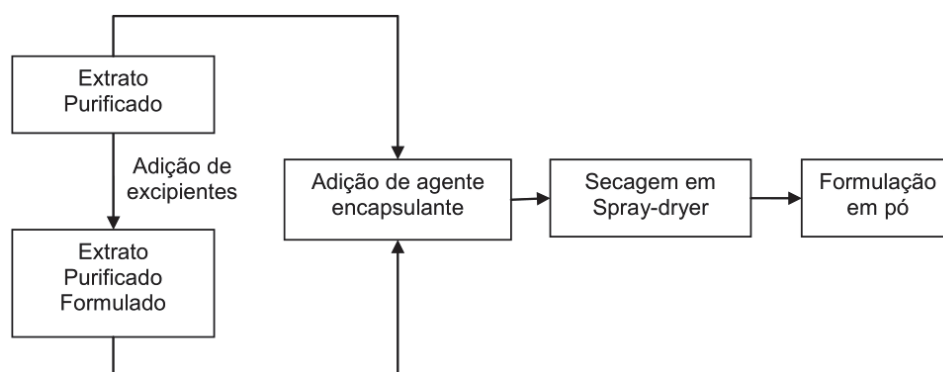


FIGURA 3.1. ESQUEMA DE SECAGEM DO EXTRATO AMILOLÍTICO POR SPRAY-DRYER

Para análise de atividade enzimática, as amostras secas foram reconstituídas com tampão fosfato de sódio 0,05M (pH 7,0), massa de 0,1 g em 10 mL de tampão.

A atividade enzimática foi imediatamente determinada conforme item 2.2. Foi acompanhada a estabilidade enzimática durante um período de 120 dias.

2.6 ANÁLISE DE PRODUTO FORMULADO DE AMILASE EM PÓ EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após secagem em *spray dryer* as amostras foram analisadas quanto à morfologia por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras de produto formulado de amilase em pó foram fixadas em um suporte com auxílio de fita de cobre e foram submetidas ao recobrimento metálico com ouro, espessura de 8 nm sob atmosfera de argônio. As amostras metalizadas foram submetidas à análise em Microscópio Eletrônico de Varredura TESCAN VEGA3 TESCAN.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO EXTRATO BRUTO DE AMILASE PRODUZIDO POR FSM POR *ASPERGILLUS oryzae* LPB 5593

O extrato purificado de amilase produzido por *Aspergillus oryzae* LPB 5593 em FSm foi analisado quanto à sua estabilidade em diferentes condições de armazenamento: temperatura ambiente (A), incubação em estufa a 37°C (E), sob refrigeração (R). Os resultados de atividade residual do extrato enzimático amilolítico são apresentados na Figura 3.2.

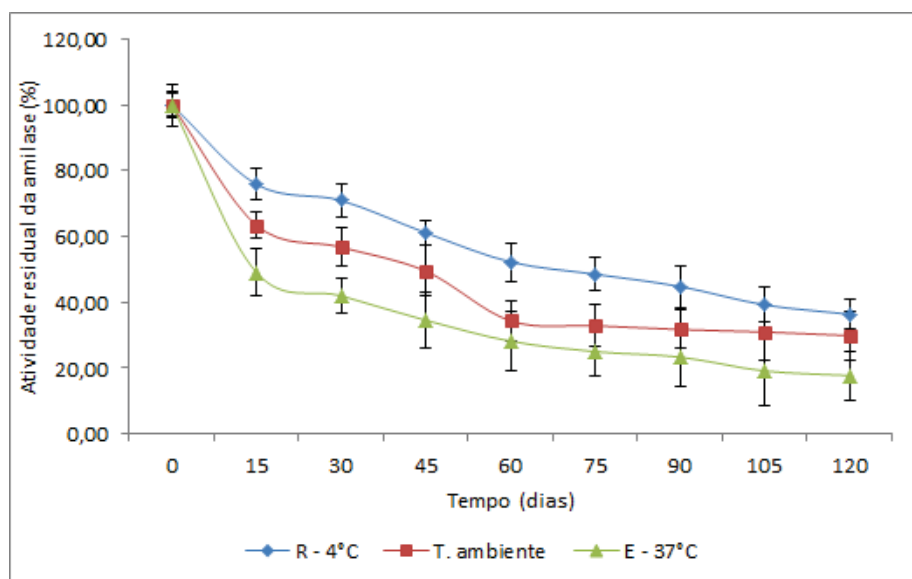


FIGURA 3.2. ESTUDO DA ATIVIDADE AMILOLÍTICA DO EXTRATO PURIFICADO PRODUZIDA POR *Aspergillus oryzae* NRRL 5593 POR FSm EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO: REFRIGERAÇÃO (4°C), TEMPERATURA AMBIENTE (A) E ESTUFA (37°C).

Observa-se que houve um decréscimo na atividade de amilase do extrato enzimático para todas as condições nos primeiros 45 dias. As amostras armazenadas sob refrigeração (4°C) perderam 38,90 % de atividade, enquanto que as demais, incubadas a 37°C e armazenadas à temperatura ambiente (25°C) perderam 65,49% e 50,56% de atividade, respectivamente. Ao final de 120 dias, as amostras armazenadas sob refrigeração, mantiveram em torno de 40% da atividade residual. As amostras armazenadas a temperatura ambiente sofreram redução acelerada da atividade, atingindo apenas 30% de atividade residual. Este resultado era esperado porque nesta condição, a amostra fica mais suscetível às variações do ambiente, além de ser vulnerável a contaminações microbiológicas.

A partir dos experimentos conduzidos, ressalta-se que a enzima microfiltrada mantida sobre refrigeração, sem adição de aditivos, perde em torno de 60% da atividade quando não recebe adição de conservantes ou estabilizantes. EL-SHERBINY e EL-CHAGHABY (2012) estudaram a estabilidade com armazenamento a 4 e 30°C de enzimas líquidas comerciais. Amostras contendo enzimas amilases com as mesmas atividades iniciais e com a mesma origem biológica foram distribuídas em frascos com água e com glicerol. O estudo mostrou que as amilases armazenadas a 4°C demonstraram 117% de estabilidade com o uso do glicerol. As

amostras armazenadas sob refrigeração a 4°C em água ou glicerol apresentaram percentual de recuperação enzimática superior em comparação com as armazenadas a 30°C. Tais resultados corroboram com os obtidos no presente trabalho.

O glicerol, assim como o sorbitol, é citado como excelente aditivo na conservação de enzimas, tais como catalase e transglutaminase (COSTA et al., 2002; BOURNEOW; BENJAKUN; KITTIKUN, 2012), glicose oxidase (YE; COMBES; MONSAN, 1988) e α -amilase (ASHTER; MEUNIER, 1990).

3.2 FORMULAÇÃO DA ENZIMA AMILASE PRODUZIDA EM FSm POR *ASPERGILLUS oryzae* LPB 5593

3.2.1 Seleção de componentes para formulação de produto contendo α -amilases

Os aditivos estudados foram selecionados com base no “Regulamento técnico Anexo III, o qual traz a lista de aditivos e Resolução CN/MS n.4 de 24 de novembro de 1988 que estabelece os limites máximos, com base na sua função desempenhada na formulação de acordo com Rowe et al. (2009), e em relatos da literatura. Os estudos foram desenvolvidos com o emprego de aditivos aprovados e sem restrição para aplicação em alimentos conforme designação da ANVISA (1988, 2005).

A temperatura de incubação foi de 37 \pm 2°C, a qual é a temperatura padrão de determinação de atividade de amilase. No estudo de estabilidade acelerada preconizado pela ANVISA (2002), o objetivo é estudar a influência de compostos em condições adversas. A duração do estudo é normalmente 15 dias e há diversas faixas de temperaturas sugeridas pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004). A escolha da temperatura de 37°C, a qual é a temperatura de hidrólise normalmente utilizada para a α -amilase, deve-se ao fato de nesta condição ocorrer a degradação enzimática de maneira acelerada. As amostras contendo os diferentes aditivos foram analisadas quanto à sua atividade enzimática no 15º dia. Os aditivos com a melhor resposta para a estabilização da atividade amilásica na primeira fase foram selecionados para a fase seguinte.

Os resultados da Figura 3.3 se referem à atividade residual das formulações em relação à atividade inicial do extrato sem aditivos. Resultados mais significativos na conservação da atividade da amilase foram obtidos com o ácido benzóico [2C] 45,1%, PEG 400 [C] 54,13% e sorbitol [C] 58,82%, os quais foram selecionados para as próximas etapas de estudo. A xilose promoveu a manutenção de 38,47% de atividade residual na concentração [2C]. O CITNa (citrato de sódio) não mostrou efeito positivo sobre a estabilidade da amilase levando a uma manutenção de atividade residual de 7,94% para a concentração [C] e 6,90% para a concentração [2C].

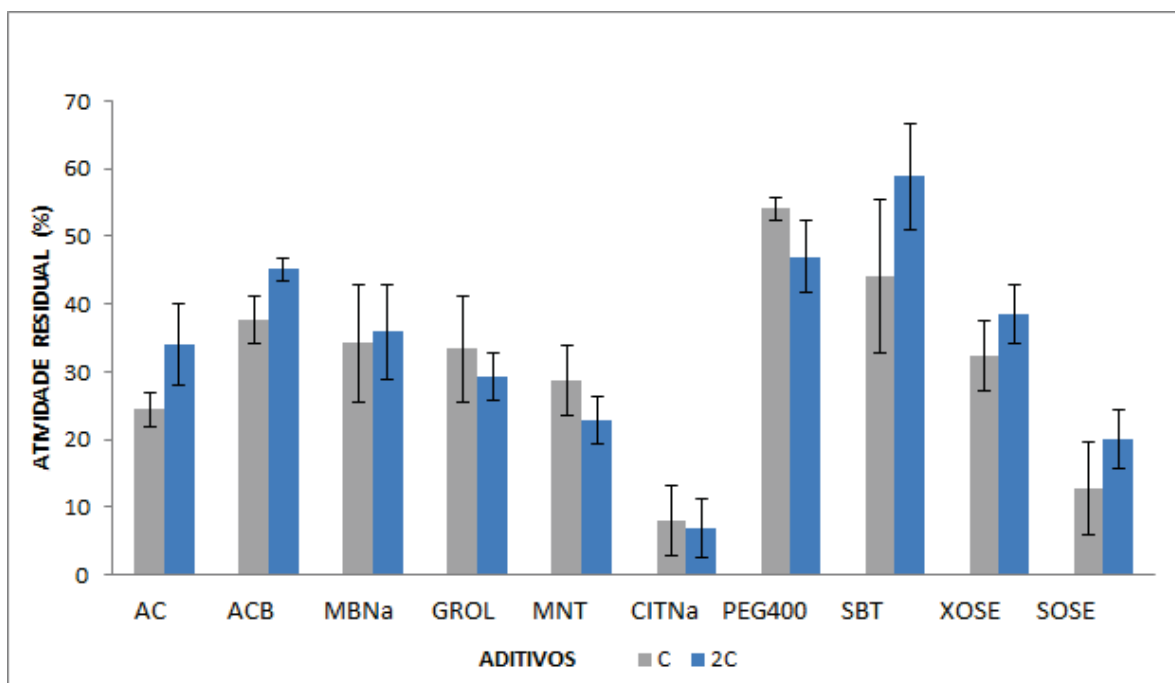


FIGURA 3.3. EFEITO DOS DIFERENTES ADITIVOS NA ATIVIDADE DA AMILASE. A PRIMEIRA COLUMNA REPRESENTA O EFEITO DA MEIA CONCENTRAÇÃO [C] E A SEGUNDA REPRESENTA A MÁXIMA CONCENTRAÇÃO PERMITIDA [2C]. ACC – ácido cítrico, ACB – ácido benzoico, MBNa – metabissulfito de sódio, GROL – glicerol, MNT – manitol, CITNa – citrato de sódio, PEG400 – polietilenoglicol, SBT – sorbitol, XOSE – xilose, SOSE – sucrose.

3.2.2 Estudo de interação dos aditivos selecionados para formulação da enzima α -amilase

Os melhores aditivos testados na etapa de seleção foram combinados em um experimento realizado com o suporte de um planejamento experimental do tipo fatorial completo 2^3 com 3 pontos centrais para avaliar a influência de suas interações sobre a manutenção da atividade enzimática.

A combinação do ensaio 2 (Tabela 3.3) com o uso dos aditivos PEG400 e SBT levou à manutenção de 86,25% da atividade inicial após 15 dias de incubação (TABELA 3). O experimento controle mostrado no experimento1, no qual não se faz o uso de aditivos, ocorreu 60,96% da atividade residual inicial. Pode-se observar que algumas combinações de aditivos pré-selecionados não apresentaram bons resultados considerando seus usos em separado. Combinações feitas na presença do ácido benzoico (ACB) foram as que apresentaram resultados inferiores principalmente quando combinado com o sorbitol (SBT) sem a presença do polietilenoglicol (PEG 400) alcançando apenas 6,95%. A resposta obtida mostrou que a combinação de aditivos traz obviamente efeitos protetores em relação ao controle, porém, quando utilizados de forma conjugada alcançaram respostas superiores que aquelas obtidas individualmente. Observou-se complexidade nas interações entre os aditivos, uma vez que as respostas oscilaram seus valores entre 7,91 e 11,24% quando do uso da metade da concentração para os três aditivos combinados. O pH se manteve estável entre 6,0 e 6,5 porém, foi o mesmo apresentado pelo extrato amilolítico (controle), o que indica que as interações de aditivos estudadas não afetaram o pH natural, contribuindo para o excelente resultado.

TABELA 3.3. INFLUÊNCIA DOS ADITIVOS ÁCIDO BENZOICO, PEG 400 E SORBITOL SOBRE ATIVIDADES RESIDUAIS DE α -AMILASE.

Ensaio	Aditivos			Atividade Residual (%)
	ACB	PEG 400	SBT	
1	0	0	0	60,964
2	0	1	5	86,253
3	0	2	2,5	48,684
4	0,05	0	5	6,953
5	0,05	1	2,5	9,715
6	0,05	2	0	8,689
7	0,1	0	2,5	7,022
8	0,1	1	0	52,542
9	0,1	2	5	36,172
10C	0,05	1	2,5	8,837
11C	0,05	1	2,5	7,919
12C	0,05	1	2,5	11,242

Na Figura 3.4, a análise do Diagrama de Pareto mostra os efeitos das variáveis estudadas sobre a atividade enzimática. É possível observar o efeito positivo para PEG 400 e SBT na proteção da atividade enzimática nas concentrações estudadas, além da influência negativa do ACB. De acordo com o ensaio 2 as concentrações de sorbitol 5% e PEG 400 1%, na ausência de ACB, apresentam maior preservação na atividade da amilase em 86,25%. A utilização de polióis apresenta efeito positivo com aumento na proteção da enzima (WANG et al., 2014). Estudos mostram que o sorbitol é um eficiente aditivo na preservação de outras enzimas, tais como lipase (NOEL; COMBES, 2003) hexoquinase (TIWARI; BHAT, 2006) amilase (YADAV; PRAKASH, 2011), tripsina (PAZHANG et al., 2015) e xilanase (LE MOS et al., 2000). Os resultados da ANOVA mostraram um coeficiente de determinação $R^2 = 0,99841$ para $p < 0,05$.

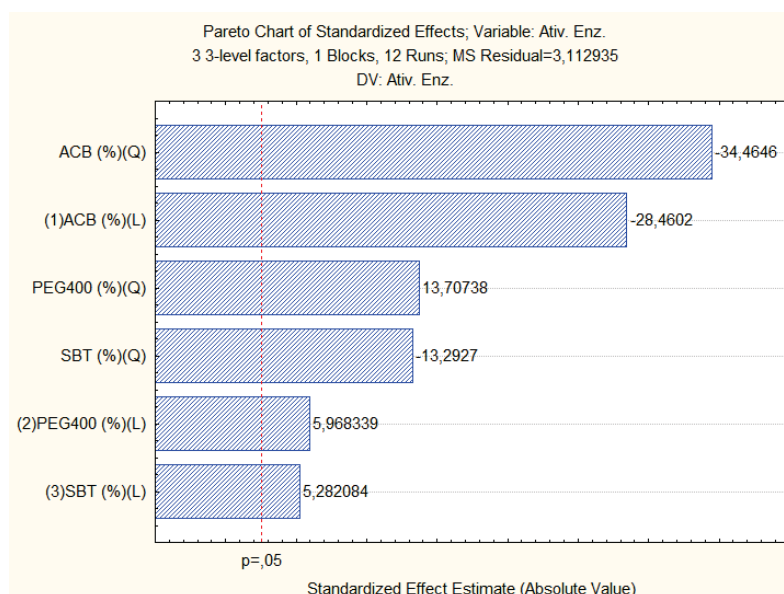


FIGURA 3.4. DIAGRAMA DE PARETO MOSTRANDO OS EFEITOS SIGNIFICATIVOS DOS ADITIVOS ACB, PEG 400 E SBT NA CONSERVAÇÃO DA ATIVIDADE DE AMILASE

3.2.3 Teste de estabilidade da formulação da enzima amilase

A formulação proposta para o extrato amilolítico (extrato enzimático pré-purificado adicionado de sorbitol 5% e PEG 400 1%) foi avaliada nas condições de refrigeração 4°C e a temperatura ambiente. Cada forma de armazenagem teve um grupo controle, denominados CA o controle sem aditivos incubados em temperatura ambiente e CR o controle sem aditivos incubados sob refrigeração.

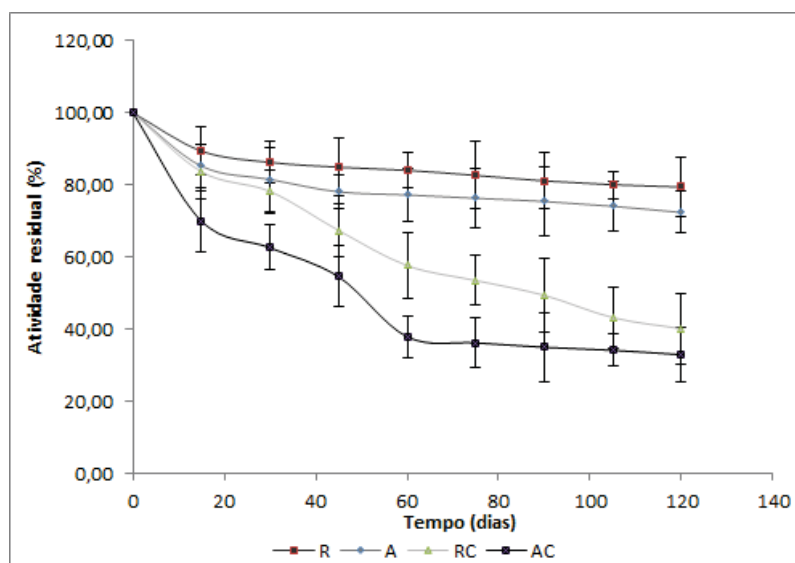


FIGURA 3.5. ATIVIDADE AMILÁSICA RESIDUAL COMPARANDO AMOSTRAS FORMULADAS COM ADITIVOS (A) E (R) E NÃO-FORMULADAS (AC) E (RC).

Após 120 dias, as atividades residuais foram de 79,43% para o extrato formulado sob refrigeração e 72,37% para o formulado mantido a temperatura ambiente. Por outro lado, as atividades residuais do extrato enzimático sem formular armazenado sob refrigeração e mantido a temperatura ambiente, foram de 40,12% e 32,92%, respectivamente. O estudo mostra a importância do uso dos aditivos para a preservação da atividade enzimática.

O maior percentual de perda de atividade para o extrato formulado ocorreu entre os primeiros 30 a 40 dias registrando 15% de redução na atividade para o extrato formulado mantido sob refrigeração. Por outro lado, as perdas registradas para a amostra controle sob refrigeração foram mais acentuadas durante os primeiros 60 dias chegando a 57,61%. Perdas maiores ocorreram na amostra não formulada e mantida a temperatura ambiente, onde os índices chegaram a 62,13% nos primeiros 60 dias. Observou-se que a degradação enzimática foi menos acentuada quando no período total de 120 dias, demonstrando que os primeiros 45 dias de armazenamento são os mais críticos do processo. Ao final do armazenamento de 120 dias houve perda de apenas 20,57% de atividade no extrato formulado armazenado sobre frigerção confirmando a eficiência da formulação na proteção da amilase.

Resultados semelhantes foram obtidos por Salmon e colaboradores (2011) quando estudaram a estabilidade de um formulado enzimático contendo fitase de *Schizophyllum* sp. O produto líquido desenvolvido foi estável com a presença de manitol e polietilenoglicol a 1% (m/v), sendo capaz de manter 90% da sua atividade após 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente enquanto a enzima não formulada manteve apenas 67% de sua atividade. Kammoun et al. (2009) utilizou polietilenoglicol para estabilização de amilase atingindo 72% de estabilidade ao final do experimento.

A adição de aditivos na formulação da amilase foi extremamente positiva, considerando que de forma geral, após processos de purificação, as enzimas podem ficar mais suscetíveis a degradações do que em sua forma natural. A manutenção da atividade de uma formulação enzimática durante 120 dias em níveis próximos de 80% pode ser considerado um ótimo resultado.

3.3. SECAGEM POR *SPRAY-DRYER* DO EXTRATO AMILOLÍTICO PARA OBTENÇÃO DE PRODUTO EM PÓ

Os estudos de secagem por *spray dryer* foram realizados com o extrato purificado e formulado conforme item 2.4.2. O extrato enzimático foi submetido à secagem após adição de maltodextrina na concentração de 15% (m/v) em solução aquosa contendo 5% (v/v) de extrato enzimático formulado.

Logo após a secagem, a amostra do produto enzimático contendo amilase (amostra LPB), registrou atividade amilolítica de $8112,35 \text{ U.mL}^{-1}$, chegando ao final dos 100 dias com $7301,01 \text{ U.mL}^{-1}$, indicando 89,99% de atividade residual conforme Figura 3.6. O uso de maltodextrina levou a uma satisfatória manutenção da estabilidade da amilase. Embora os dados sejam satisfatórios, observa-se perdas de atividade durante o período avaliado.

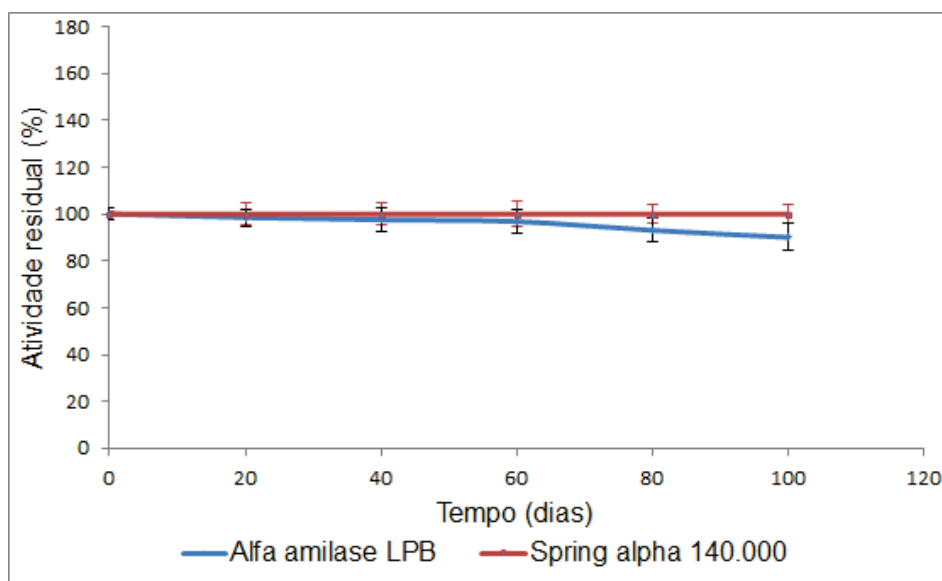


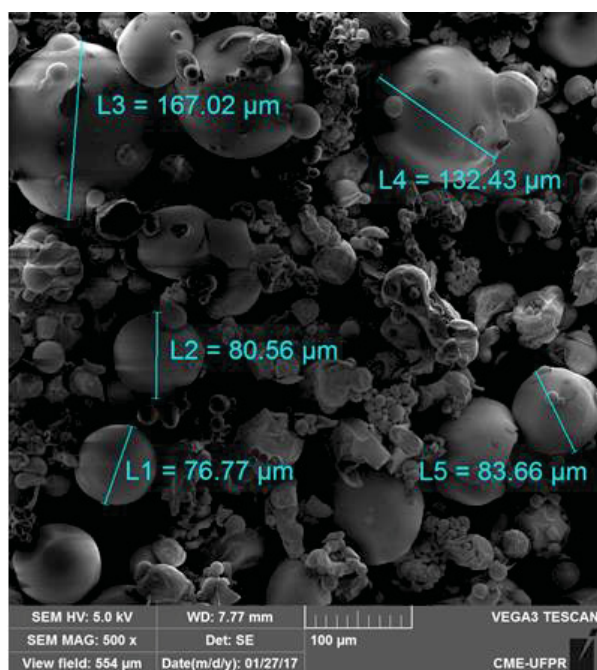
FIGURA 3.6 - ESTABILIDADE DE AMILASE EM PÓ OBTIDA POR SPRAY-DRYING.

A enzima comercial em pó Spring Alpha 140.000 apresentou atividade amilolítica de $9456,38 \text{ U.mL}^{-1}$, sem ocorrência de perdas de atividade durante o período avaliado. As perdas de atividade da amostra LPB podem estar relacionadas à ineficiência do processo de secagem, relacionada às condições e equipamento utilizado. Ainda, foi empregada a maltodextrina como agente encapsulante. Outros agentes e suas combinações (antioxidantes, antiumectantes e outros) poderiam ser avaliados futuramente com o objetivo de melhorar a estabilidade enzimática.

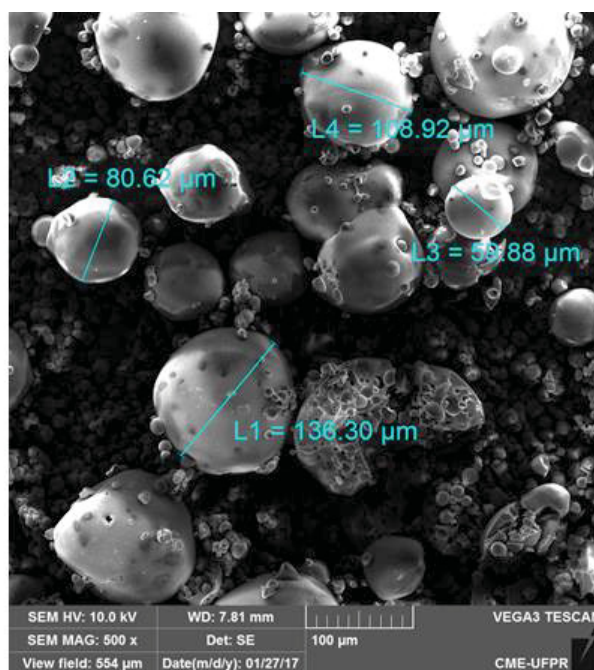
3.4 ANÁLISE DE PRODUTO FORMULADO DE AMILASE EM PÓ EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A morfologia das partículas obtidas por *spray drying* foi avaliada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens a seguir (FIGURA 3.7 A e B) ilustram a morfologia das partículas obtidas pela análise da amostra LPB e da enzima comercial. Na Figura 3.7 (A) é possível observar as micrografias de MEV da amostra LPB na qual é possível verificar uma distribuição de tamanho das partículas variando aproximadamente entre 76 a 170 μm ; e na Figura 3.7 (B) observa-se a amostra da enzima comercial apresentando uma distribuição também similar, mas com distribuição de tamanho numa faixa menor (60-140 μm). Tais diferenças podem

estar relacionadas ao tamanho do bico atomizador do equipamento utilizado na secagem. Outros fatores tais como agentes encapsulantes, fluxo de ar, temperatura e pressão podem igualmente influenciar as características da partícula. Em relação à forma, as partículas se apresentam como esferas densas e texturalmente lisas. Entretanto, pode haver defeitos na estrutura devido ao processamento, tais como, bolhas ou vazio devido ao processo de secagem. Características morfológicas similares foram encontradas por Tonon, Brabet e Hubinger (2009b) na microencapsulação do suco de açaí por *spray drying* e por SAMBORSKA et al. (2007) para purificação de α -amilases. Porras-Saavedra et al. (2015) estudaram as propriedades microestruturais e distribuição dos componentes em micropartículas obtidas por *spray-drying* encapsuladas com goma arábica, maltodextrina e proteína isolada de soja e, através de microscopias eletrônicas, observaram que as microestruturas obtidas das amostras de proteína isolada de soja em maltodextrina apresentavam superfície rugosa.



(A) α -amilase LPB



(B) enzima α -amilase comercial

FIGURA 3.7 MICROGRAFIA ELETRONICA DE VARREDURA DA COMBINAÇÃO 20% MALTODEXTRINA COM 5% DO EXTRATO ENZIMÁTICO FORMULADO (A), 20% MALTODEXTRINA COM 5% EXTRATO ENZIMÁTICO NO FORMULADO (B), UTILIZANDO AUMENTO DE 1.00 Kx E ESCALA DE 50 μ m.

4 CONCLUSÃO

O estudo de formulação da amilase produzida por *Aspergillus oryzae* LPB 5593 via FSm foi realizado a partir do extrato obtido. Dentre os aditivos avaliados, o polietilenoglicol (PEG 400) e o sorbitol foram os que se destacaram na conservação e manutenção da atividade amilolítica. Quando comparadas com a amilase produzida por fermentação submersa com e sem aditivos, as amostras incubadas em temperatura ambiente conservaram 86,05% da atividade da enzima e o controle sem aditivos e 67,56% a atividade da amostra. Para os testes finais a formulação foi composta de 1% de PEG 400 e 2,5% de sorbitol que foram adicionados ao extrato enzimático concentrado. Nas condições testadas, a conservação da enzima em termos de atividade residual foi de 72,37% a temperatura ambiente e 79,43% sob refrigeração a 4°C após 120 dias. O extrato amilolítico semi purificado armazenado sob refrigeração a 4°C por 120 dias sem adição de aditivos e utilizados como controle, apresentou índice de estabilidade comparativo às amostras formuladas nos primeiros 30 dias, registrando 78,19% de atividade residual, ou seja, 7,1% menor que a amostra formulada refrigerada. Tal comportamento pode indicar que o extrato amilolítico possui substâncias que auxiliam na manutenção de sua bio-atividade, porém, os mesmos podem se degradar quando expostos à elevada temperatura ou longo, o que eleva a importância da formulação líquida obtida.

O produto obtido pelo método do *spray-dryer* apresentou características semelhantes ao produto comercial. Houve baixa degradação da enzima em pó (10% de perda da atividade) durante o processo de armazenamento ao longo de 120 dias. Estudos futuros serão realizados com o intuito de testar novos agentes encapsulantes e aditivos (antioxidantes, antiumectantes e outros) para a manutenção da atividade total da enzima.

5 REFERÊNCIAS

AULTON ME 2002. *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*. 2 ed. **Edinburg: Churchill Livingstone**, p. 388-390.

ANSEL; POPOVICH; ALEN, 2007 WANG, D.; LU, M.; WANG, X.; JIAO, Y.; FANG, Y.; LIU, Z.; WANG, S. Improving stability of a novel dextran-degrading enzyme from marine *Arthrobacter oxydans* KQ11. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 294-299, 2014.

ASTHER, M.; MEUNIER, J.C. Increased thermal stability of *Bacillus licheniformis* α -amylase in the presence of various additives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 902-905, 1990.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Séries temáticas – Guia de estabilidade de produtos cosméticos, 2004. **Disponível em:** <www.portal.anvisa.gov>. Acesso em: 03/12/2015.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO CNS/MS N.º 04, DE 24 DE NOVEMBRO DE 1988. **Disponível em:** <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2d98d4804745761d8413d43fbc4c6735/Resolucao_04_1988.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 08/01/2016.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Disponível em:** www.portal.anvisa.gov. Acesso em 24/07/2015.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE nº 560, de 2 de abril de 2002. **Disponível em** <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em abril/2016.

ASLAN, Y.; TANRISEVEN, A. Immobilization of *Penicillium lilacinum* dextranase to produce isomaltooligosaccharides from dextran. **Biochemical Engineering Journal** 34: 8–12, 2007.

BAKER, R. W. *Membrane Technology and Applications*. 2. ed. **Chichester: John Wiley & Sons Ltd.**, 2004.

BOURNEOW, C.; BENJAKUL, S.; H-KITTIKUN, A. Impact of some additives on the stability of microbial transglutaminase from *Providencia* sp. C1112. **As. J. Food Ag-Ind.** n.5, v.03, p. 226-233, 2012.

CHERYAN, M. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Pennsylvania: **Technomic Publishing Company Inc.**, 1998.

COSTA, S. A.; TZANOV, T.; CARNEIRO, A. F.; PAAR, A.; GÜBITZ, G. M., CAVACO-PAULO, A. Studies of stabilization of native catalase using additives. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 30, p. 387–391, 2002.

E L V HARRIS AND S ANGEL . Protein purification methods: A practical approach. pp 317. IRL **Press at Oxford University Press, Oxford**. 1989.

EL-SHERBINY, M. A.; EL-CHAGHABY, G. A. Storage temperature and stabilizers in relation to the activity of commercial liquid feed enzymes: a case study from Egypt. **Journal of Agrobiology**, v. 28, n. 2, p. 129–137, 2012.

FRANCO COLACINO & ROBERT R. CRICHTON (1997) Enzyme Thermostabilization: the State of the Art. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 14:1, 211-278.

GULLA, K.C., M.D. GUODA, M.S. THAKUR AND N.G. KARANTH, 2004. Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. **Biosensors Biotechnol.** 19: 621- 625. DOI: 10.1016/S0956-5663(03)00258-6.

GULLA, K. C.; GOUDA, M. D.; THAKUR, M. S.; KARANTH, N G. Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 19, p. 621–625, 2004.

JINGLIN FU, JEREMY REINHOLD, AND NEAL W. WOODBURY. Peptide-Modified Surfaces for Enzyme Immobilization. **PLoS One**. 2011; 6(4): e18692.

JENSEN, B., OLSEN, J., 2003. Physicochemical properties of a purified α -amylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology** 14, 112–116.

JOANA PAULA MENEZES BIAZUS , JOSÉ CARLOS CURVELO SANTANA, ROBERTO RODRIGUES DE SOUZA, ELIAS BASILE TAMBOURGI. Purification of amylases from Zea mays malt. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, 30(1): 218-223, jan.-mar. 2010

KATARZYNA SAMBORSKA,DOROTA WITROWA-RAJCHERT,ANDRE GONÇALVES.Spray-Drying of α -Amylase—The Effect of Process Variables on the Enzyme Inactivation. Pages 941-953 - Published online: 06 Feb 2007.

LEMOS, J. L. S.; BON, E. P. S.; SANTANA, M. D. F. E.; PEREIRA, N. Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n.3, p. 206–211, 2000.

LUCAS, T. I.; BISHARA, R. H.; SEEVERS, R. H. A stability program for the distribution of drug products. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 68-73, 2004.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MASTERS K 1985. *Spray Drying Handbook*. **4. ed. Londres**: George Godwin.

MONGA M, GOYAL M, KALRA KL, SONI G. 2011 – Production and stabilization of amylases from *Aspergillus niger* Mycosphere 2(2), 129–134.

NOEL, M.; COMBES, D. Rhizomucor miehei lipase: Differential scanning calorimetry and pressure/temperature stability studies in presence of soluble additives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 2-3, p. 299–308, 2003.

ÖLÇER, Z.; TANRIVESEN, A. Co-immobilization of dextransucrase and dextranase in alginate. **Process Biochemistry**, 45:1645–1651, 2010.

PAZHANG, M., MEHRNEJAD, F., PAZHANG, Y., FALAHATI, H.; CHAPARZADEH, N. Effect of sorbitol and glycerol on the stability of trypsin and difference between their stabilization effects in the various solvents. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. 1-8, 2015. Disponivel em: Wiley Online Library.

P. BERNFELD, Enzymes of starch degradation and synthesis, Adv. **Enzymol.** 12, (1951) 397–427.

PORRAS-SAAVEDRA, J.; PALACIOS-GONZÁLEZ, E.; LARTUNDO-ROJAS, L.; et al. Microstructural properties and distribution of components in microparticles obtained by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, v. 152, p. 105–112, 2015.

RADHOUANE KAMMOUN*, HICHEM CHOUAYEKH, HAJEUR ABID, BELGACEM NAILI, SAMIR BEJAR. Purification of CBS 819.72 α -amylase by aqueous two-phase systems:Modelling using Response Surface Methodology. **Biochemical Engineering Journal** 46 (2009) 306–312

RAMESH, M.V., LONSANE, B.K., 1989. Solid state fermentation for production of higher titers of thermostable α -amylase with two peaks for pH optima by *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters** 11, 49–52.

R. KAMMOUN, B. NAILI, S. BEJAR, Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product), Bioresour. **Technol.** 99 (13) (2008) 5602–5609.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6. ed. Washington: **Pharmaceutical Press**, 2009.

ROGALSKI, J.; SZCZODRAK, J.; PLESZCZYHKA, M.; FIEDUREK, J. Immobilisation and kinetics of *Penicillium notatum* dextranase on controlled porous glass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 3:271-283, 1997.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6. ed. Washington: **Pharmaceutical Press**, 2009.

REYNOLDS, D. W.; FACCHINE, K. L.; MULLANEY, F. J.; ALSANTE, K. M. HATAJIK, T. D.; MICHEL, M. G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, n. 2, p. 48-56, 2002.

SAMBORSKA, K., 2007. Enhancement of thermal stability of *Aspergillus oryzae* alpha-amylase using stabilizing additives. **Acta Agrophy.**, 9(1): 233-244.

S.R. WEIJERS, K. VAN'T RIET. Enzyme stability in downstream processing part 1: Enzyme inactivation, stability and stabilization. **Biotechnology Advances**. Volume 10, Issue 2, 1992, Pages 237-249.

Shaw FV 1997. Spray drying as an alternative granulation technique. In: Parikj DM. Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology. **Nova York: Marcel Dekker**, p. 75-96.

SUSANTO, H.; ULBRICHT, M. Characteristics, performance and stability of polyethersulfone ultrafiltration membranes prepared by phase separation method using different macromolecular additives. **Journal of Membrane Science**, v. 327, p. 125-135, 2009.

TIWARI, A.; BHAT, R. Stabilization of yeast hexokinase A by polyol osmolytes: Correlation with the physicochemical properties of aqueous solutions. **Biophysical Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 90–99, 2006.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 444–450, 2009b.

TONON, R. V.; BARONI, A. F.; BRABET, C.; GILBERT, O.; PALLET, D.; HUBINGER, M. D. Water sorption and glass transition temperature of spray dried açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) juice. **Journal of Food Engineering**, v. 94, n. 3-4, p. 215–221, 2009a.

YE, W. N.; COMBES, D. MONSAN, P. Influence of additives on the thermostability of glucose oxidase. **Enzyme Microbial Technology**, v. 10, p. 498-502, 1988.

YADAV, J. K.; PRAKASH, V. Stabilization of α -Amylase, the Key Enzyme in Carbohydrates Properties Alterations, at Low pH. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 6, p. 1182–1196, 2011.

CAPÍTULO IV IMOBILIZAÇÃO DA α -AMILASE POR ENVOLVIMENTO EM MATRIZES DE ALGINATO DE SÓDIO-KEFIRAN

A imobilização de enzimas é uma alternativa para a sua aplicação industrial, uma vez que enzimas imobilizadas são facilmente separadas do meio reacional e podem ser re-utilizadas por diversos ciclos. Existem diversas técnicas e suportes que podem ser utilizados na imobilização de enzimas. A técnica de envolvimento é uma das técnicas mais simples e consiste no encapsulamento de enzimas em microesferas ou partículas de gel compostas de alginatos, géis poliméricos, dentre outros. Este trabalho teve como objetivo avaliar o uso de polissacarídeos de alginato de sódio e kefiran, individualmente ou em mistura, para o envolvimento de α -amilase produzida por fermentação para aplicação em processos industriais. A enzima α -amilase foi obtida por FSm utilizando linhagem de *Aspergillus oryzae* LPB 5593. As microesferas foram preparadas pelo método do gotejamento com solução de α -amilase pré-purificada em membranas de micro e ultrafiltração, Kefiran 4% e alginato de sódio 4%(m/v). Após a imobilização as microesferas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia de Infravermelho Transformada por Fourier (FTIR) e Termogravimetria (TG). A estabilidade da enzima imobilizada foi determinada em um período de 21 dias nas diferentes condições. A enzima imobilizada em micro esferas de tamanho 3,75 mm, em uma proporção 1:1 de alginato de sódio:kefiran, promoveu a maior estabilidade da enzima 75%. Além disso, as esferas com α -amilase imobilizada puderam ser re-utilizadas em até 4 ciclos de utilização, mostrando que uma aplicação industrial seria possível. Outras vantagens da enzima imobilizada foram observadas, tais como o deslocamento da curva de estabilidade térmica, que mostrou que a enzima imobilizada apresenta temperatura ótima entre 50 °C e 60°C, enquanto que a mesma enzima livre age melhor em torno de 40°C. A curva de pH também apresentou pequenas mudanças significativas no que se refere a uma maior resistência da enzima imobilizada a pHs mais ácidos e mais alcalinos.

1 INTRODUÇÃO

O desempenho de enzimas e microrganismos em aplicações comerciais pode muitas vezes ser melhorado pela imobilização destes biocatalisadores. A imobilização é uma das melhores técnicas para aplicações industriais de enzimas (JADHAV et al., 2014). As principais técnicas de imobilização são ligação covalente ou adsorção em suportes sólidos, envolvimento e encapsulamento em géis poliméricos, e ligação cruzada. O efeito de imobilização nas propriedades enzimáticas e estabilidade de biocatalisadores são discutidos quando aplicados nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos, em análises clínicas e químicas, na medicina, bem como em tecnologia enzimática. Células ou enzimas imobilizadas apresentam vantagens, tais como uso de um único lote em diversos ciclos de aplicação, são mais estáveis, é possível interromper a reação com a retirada da enzima do meio reacional, não contaminam o produto e promovem a redução de problemas como descarte de efluentes.

Efeitos da imobilização sobre a atividade, estabilidade e até seletividade de algumas enzimas têm sido bem documentados (WILSON et al. 2006; MATEO et al., 2007). Contudo, há algumas desvantagens tais como, restrições no que se refere à difusão do substrato até o microambiente da enzima, ou seja, limitações de transferência de massa, bem como os custos adicionais ligados ao próprio processo de imobilização (GUPTA et al., 2011).

Existem várias matrizes, tais como alginato, poliacrilamida e ágar-ágar que são empregados para imobilização de enzimas. Alginatos são de grande interesse, possuem baixo custo, são seguros, têm boa resistência mecânica e têm porosidade para o substrato e difusão do produto (TALEKAR e CHAVARE, 2012). O alginato de cálcio é uma matriz rentável e biocompatível para o aprisionamento de diferentes enzimas incluindo α -amilase, protease e pectinase (REHMAN et al., 2013; RIAZ et al., 2009). Além disso, este método provoca perturbações mínimas na estrutura enzimática e, conseqüentemente, na atividade. É um carboidrato coloidal hidrofílico extraído de várias espécies de algas marrons (TURBIANI et al., 2011). Os alginatos são polissacarídeos compostos de moléculas de ácido manurônico e gulurônico. São aniônicos e amplamente distribuídos nas paredes celulares das algas castanhas e

comumente utilizados para a formação de grânulos capazes de aprisionar diversas macromoléculas na forma de microesferas de alginato de cálcio (LE-TIEN et al., 2004; SATAR et al., 2008). Têm muitas aplicações em diversas áreas de Biociências e Biotecnologia. Na indústria de alimentos e bebidas são utilizados como espessantes, agentes gelificantes ou estabilizadores coloidais (SMIDSROD e SKJÅK-BRAEK, 1990). Os alginatos oferecem um ambiente aquoso relativamente inerte no interior da matriz de gel de alta porosidade, a qual permite elevadas taxas de difusão de macromoléculas. Os alginatos apresentam elevada afinidade por α -amilases (ROY et al., 2000). Para aplicações em biotecnologia, o alginato é utilizado principalmente sob a forma de grânulos usualmente preparados por gotejamento a partir de seringa; cujo diâmetro e forma dos grânulos formados dependem do orifício e da viscosidade da solução de alginato (SMIDSROD e SKJÅK-BRAEK, 1990). A enzima fica aprisionada dentro do espaço da matriz estruturada sem que haja impacto sobre as suas propriedades catalíticas. Outros métodos conhecidos são atomização, pulverização e emulsificação de água-em-óleo utilizados para preparar microesferas menores do que 0,2 milímetros de diâmetro (GOMBOTZ e WEE, 1998; KAFSHGARI et al., 2012; KUMARI et al., 2014).

Um outro polissacarídeo utilizado como encapsulante para enzimas é o kefiran. É o principal polissacarídeo produzido pelo kefir (PRADO et al., 2015), produzido por *Lactobacillus kefiranofaciens* (KOOIMAN, 1968; WANG et al., 2010; MAEDA et al., 2004), o qual é um heteropolissacarídeo composto igualmente por glicose e galactose (ZAJŠEK et al., 2011). Estudos feitos por RIMADA e ABRAHAM (2006) mostraram que o kefiran melhora a viscosidade e as propriedades viscoelásticas dos géis de leite ácidos e é capaz de formar géis que possuem propriedades viscoelásticas interessantes a baixas temperaturas. Por isso, o kefiran também pode ser usado como um aditivo em produtos fermentados. O kefiran tem vantagens tais como propriedades antitumorais, antifúngicas, antibacterianas (CEVIKBAS et al., 1994; WANG et al., 2008), anti-inflamatórias (DINIZ et al., 2003), e cicatrizantes (RODRIGUES et al., 2005a) e atividade antioxidante (CHEN et al., 2015). Processos simbióticos entre bactérias e leveduras presentes no kefir melhoram a quantidade de kefiran (CHEIRSILP et al., 2003).

Este capítulo tem por objetivo apresentar estudos de imobilização de α -amilase em esferas de alginato-kefir, determinar sua atividade amilolítica e comparar com a enzima livre. Por último, estudar a estabilidade de armazenagem e a reutilização da enzima imobilizada. Ainda, a enzima imobilizada foi caracterizada quanto à sua atividade em diferentes temperaturas e pHs. Análises das esferas com α -amilase imobilizadas foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho transformada por Fourier (FTIR) e estabilidade térmica por análises termogravimétricas (TG/DTG).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE α -AMILASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Aspergillus oryzae LPB 5593 proveniente do banco de linhagens do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná foi utilizado para produção de α -amilase por fermentação submersa. A cepa foi mantida em tubo contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) inclinado a 4°C. Uma suspensão de esporos foi preparada a partir do cultivo de esporos em frascos Erlenmeyer a 29°C durante 6-7 dias.

A produção de α -amilase foi conduzida por FSm em reator do tipo coluna de bolhas (BCR) durante 5 (cinco) dias a 29°C. A composição do meio utilizado foi (g.L⁻¹): amido 2,5; KH₂PO₄ 0,2; (NH₄)₂SO₄ 0,56; CaCl₂ 0,03; MgSO₄.7H₂O 0,03; ureia 1; peptona 2. A atividade enzimática foi determinada e o extrato enzimático purificado em sistema Pellicon II passando o extrato enzimático em membrana de microfiltração (0,45 μ m) e, em seguida, de ultrafiltração (30 kDa), conforme descrito no capítulo 2.

2.2 EXTRAÇÃO DE KEFIRAN

Os grãos de Kefir foram obtidos de uma cultura de Kefir tibetano mantida no Laboratório de Engenharia Bioprocessos e Biotecnologia (Universidade Federal do

Paraná, Curitiba - Brasil). Os grãos foram suspensos em água fervente durante 30 min com agitação descontínua. A mistura foi então centrifugada a 10 000 g durante 20 min a 20°C para separar a biomassa e proteínas residuais. O sobrenadante foi precipitado por adição de três volumes de etanol absoluto frio (mantido a -20 °C *overnight*). Em seguida, a mistura foi centrifugada a 10 000 g durante 20 min a 4°C e os grânulos resultantes foram dissolvidos em água fervente a 100°C. O processo de precipitação foi repetido duas vezes. Finalmente, o precipitado foi dissolvido em água quente destilada (RIMADA e ABRAHAM, 2003).

2.3 PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA α -AMILASE EM MICROESFERAS DE ALGINATO-KEFIRAN (ALG-KEF)

As microesferas foram preparadas a partir de uma solução aquosa contendo extrato de α -amilase pré-purificado, Kefiran (4% m/v) e alginato de sódio (4% m/v) em diferentes proporções de cada polissacarídeo, as quais variaram conforme descrição na Tabela 4.1. As microesferas foram preparadas pela técnica do gotejamento em CaCl_2 500 mM. As microesferas foram então lavadas duas vezes com água ultrapura e mantidas a 4° C em solução de CaCl_2 ou em água ultrapura.

Aproximadamente 1 mL de amostra de solução enzimática e polissacarídeos equivalem a 32 microesferas produzidas.

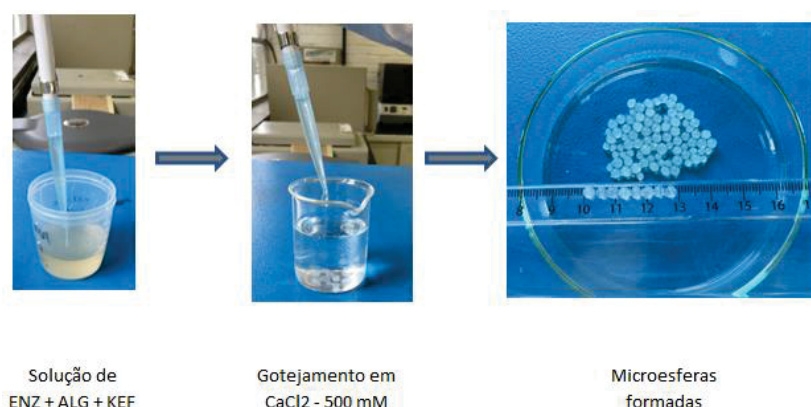


FIGURA 4.1. ETAPAS DE PREPARAÇÃO DE MICROESFERAS: 1. SOLUÇÃO DE α -AMILASE (ENZ) EM ALGINATO (ALG) E KEFIRAN (KEF); 2. GOTEJAMENTO DA SOLUÇÃO DE EZ+ALG+KEF) EM CaCl_2 500 mM PARA FORMAÇÃO DAS MICROESFERAS; 3. MICROESFERAS FORMADAS.

Os parâmetros definidos para a padronização do gotejamento foram: diâmetro da abertura do gotejador (micropipeta volume 1000 μL , com ponteira de abertura fixa em 0,1 mm) para as partículas menores com 3,75 mm de diâmetro e 0,15 mm para partículas maiores com 4,28 mm de diâmetro e, intervalo de tempo entre cada gotejamento de 10 s, a temperatura ambiente.

TABELA 4.1. COMPOSIÇÃO DAS MICROESFERAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE α -AMILASE

Amostra	Composição da matriz	Conservação e tamanho da microesfera
1	1:1:1 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas menores com CaCl_2
2	1:1:1 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas maiores sem CaCl_2
3	1:2:1 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas maiores com CaCl_2
4	1:2:1 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas maiores sem CaCl_2
5	1:1:2 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas maiores sem CaCl_2
6	1:1:2 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas maiores com CaCl_2
7	1:1:1 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas menores sem CaCl_2
8	1:2:1 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas menores sem CaCl_2
9	1:1:2 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas menores sem CaCl_2

Legenda: ENZ: solução enzimática de α -amilase; ALG: solução de alginato 4% v/v; KEF solução de Kefiran 4% v/v.

2.3.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada utilizando o substrato amido (1% m/v) a temperatura de 37°C e pH 7,0 (condições padrão de atividade) (JENSEN e OLSEN 2003; RAMESH e LONSANE 1989). Para determinação da atividade de α -amilase fez-se reação entre 160 microesferas (enzima imobilizada) e 5 mL de substrato amido solúvel a 1% (m/v), preparado em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,0). A reação ocorreu sob agitação à temperatura de 37°C durante 10 min. Os açúcares liberados após a reação, foram determinados pelo método do DNS (ácido 3, 5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Uma unidade de α -amilase é definida como a quantidade de enzima que libera açúcares redutores equivalentes a 1 μmol de maltose por minuto nas condições de ensaio padrão (BHANJA et al., 2007).

2.3.2 Determinação da taxa de imobilização

A utilização do produto (enzima) em aplicações industriais deve ser avaliada em relação a diversos fatores, dentre eles está a taxa de imobilização, visto que é uma medida do teor de enzima ativa que foi imobilizada e permanece ativa.

Segundo Jadhav et al.(2014), a taxa de imobilização (*IY%*)pode ser calculada com a seguinte equação:

$$IY \% = \frac{AIE}{AFE - AREW} \times 100 \quad (Equação 01)$$

Onde :

AIE é a atividade da enzima imobilizada em U/mL

AFE é a atividade da enzima livre em U/mL

AREW é a atividade da enzima na água de lavagem em U/mL

2.3.3. Determinação da estabilidade de α -amilase imobilizada por envolvimento

Para avaliar a estabilidade das enzimas imobilizadas, determinou-se a atividade enzimática destas (conforme capítulo 2 seção 2.3.1) em um período de 25 dias.

2.3.4 Ciclos de re-utilização da α -amilase imobilizada

Em balões volumétricos de 100 mL foram colocados 5 mL de solução aquosa de amido a 1% (m/v), em seguida foram adicionadas 160 microesferas (1 mL corresponde a 32 microesferas) e incubadas em banho-maria sob agitação a 37°C durante 10 minutos. Após 10 min de reação, as esferas foram recolhidas do meio, lavadas em água ultra pura e armazenadas sob refrigeração a 4 °C para re-utilização em diferentes ciclos de reação. Os ciclos de reuso das microesferas com α -amilase imobilizada foram avaliados pela determinação da atividade enzimática conforme descrito no item 2.3.1, após reação nos diferentes ciclos.

2.4. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E DO pH ÓTIMOS DA α -AMILASE LIVRE E IMOBILIZADA

Determinou-se a temperatura ótima da α -amilase livre e imobilizada em complexo enzima- alginato de sódio – kefiran (1:1:1), realizando ensaio de atividade enzimática a diferentes temperaturas (20-80°C). De forma semelhante, determinou-se o pH ótimo executando o ensaio de atividade em diferentes pHs (entre 3,5 e 8,5) utilizando (tampão de ácido cítrico / citrato de sódio 20 mM de pH 3,0-6,0, tampão KH_2PO_4 / K_2HPO_4 20 mM pH 7,0-8,0, tampão de glicina / NaOH 20 mM pH 9,0 - 10,0). As condições reacionais foram como descrito no capítulo 2 Seção 2.3.1.

2.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DE ESFERAS COM α -AMILASE IMOBILIZADA

As microsferas foram liofilizadas a -45° durante 24 horas até a pressão de 50 mbar (Liofilizador Modulo D, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA). As amostras foram preparadas realizando-se a pulverização catódica da superfície das amostras com ouro. A morfologia da amostra foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio FEI Quanta 450 FEG, operando a 15 keV, modo BE (elétrons retroespalhados).

2.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO TRANSFORMADA POR FOURIER (FTIR)

Espectroscopia de infravermelho FTIR para determinação de grupos funcionais foi realizada em um equipamento do Departamento Química da Universidade Federal do Paraná do tipo VERTEX 70 (Bruker), com o acessório DRIFTS (reflectância difusa) com 64 varreduras, resolução de 4 cm^{-1} , sem a eliminação da compensação atmosférica. As amostras de microesferas com α -amilase imobilizada foram previamente secas a uma temperatura de 100°C durante 24 horas, depois foram moídas e misturadas para homogeneização em KBr

espectroscópico e colocadas em acessórios DRIFTS para a aquisição dos espectros.

2.7 ESTABILIDADE TÉRMICA POR ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS (TG/DTG)

A estabilidade térmica das amostras de microesferas de α -amilase imobilizada foi avaliada por meio de análise termogravimétrica, sob atmosfera de N_2 com variação de $20^\circ\text{C}/\text{minuto}$ e fluxo de $20\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ até 800°C em um equipamento do tipo SETARAM Setsys Evolution TG/DTA/DSC do Departamento de Engenharia Florestal (BIOFIX) da Universidade Federal do Paraná.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 IMOBILIZAÇÃO DA α -AMILASE POR ENVOLVIMENTO EM MICROESFERAS DE ALGINATO-KEFIRAN (ALG-KEF)

O processo de imobilização de compostos bioativos, enzimas e células em microesferas envolve etapas de mistura da solução da biomolécula de interesse e a matriz polimérica para a formação das mesmas. A técnica do gotejamento é bastante utilizada e reprodutível. Possibilita o controle do tamanho da esfera, uma vez que os fatores envolvidos (variação do diâmetro da abertura do gotejador, viscosidade do meio, intervalo de tempo entre cada gotejamento, e controle da temperatura) são criteriosamente estabelecidos. A escolha da matriz polimérica é de extrema importância para o sucesso da técnica, visto que ele deve ser entre outros fatores, gel estável nas condições de estudo.

Neste trabalho foram escolhidas matrizes compostas de alginato, ou alginato + kefiran para a realização dos procedimentos de imobilização da enzima α -amilase produzida por fermentação submersa. As condições e parâmetros citados foram controlados, o que permitiu obtenção de microesferas homogêneas em forma e tamanho, bem como com integridade física, pois a mistura dos polissacarídeos

forma um gel forte, conforme observado em BLANDON et al (2014). A Figura 4.2 mostra imagens das microesferas formadas.

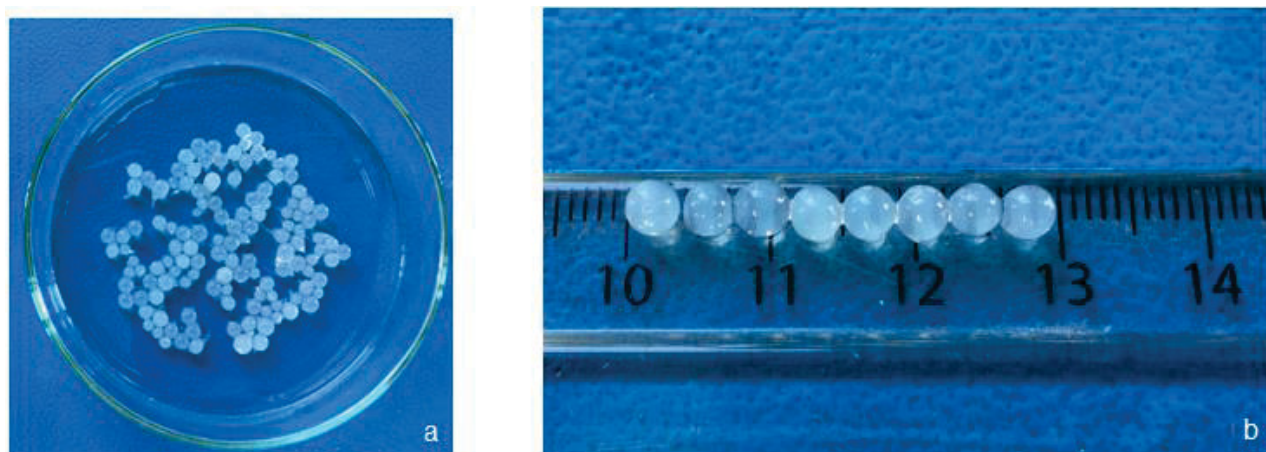


FIGURA 4.2. (A) IMAGENS DAS MICROESFERAS DE IMOBILIZAÇÃO E (B) MEDIDA DO DIÂMETRO DAS MICROESFERAS DE IMOBILIZAÇÃO DE α -AMILASE:ALGINATO:KEFIRAN (EZ: ALG:KEF).

3.1.1. Determinação da taxa de imobilização

A atividade de α -amilase imobilizada em microesferas de alginato-kefiran (ALG-KEF) foi avaliada. Diferentes proporções dos polissacarídeos (alginato de sódio e kefiran), mantendo-se a concentração de α -amilase, foram empregadas na obtenção das microesferas e estudo da influência de cada condição sobre a atividade enzimática e rendimento de imobilização (Tabela 4.2). A solução de polissacarídeos foi misturada à da enzima para em seguida proceder-se o gotejamento para a formação das microesferas.

TABELA 4.2. INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DE MICROESFERAS FORMADAS DE ALG-KEF SOBRE O RENDIMENTO DE IMOBILIZAÇÃO DE α -AMILASE

Amostra	Composição da matriz	Conservação e tamanho da microesfera	IY (%)
1	1:1:1 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas menores com CaCl_2	38
2	1:1:1 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas maiores sem CaCl_2	68
3	1:2:1 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas maiores com CaCl_2	38
4	1:2:1 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas maiores sem CaCl_2	69
5	1:1:2 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas maiores sem CaCl_2	67
6	1:1:2 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas maiores com CaCl_2	39
7	1:1:1 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas menores sem CaCl_2	75
8	1:2:1 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas menores sem CaCl_2	40
9	1:1:2 (ENZ + ALG + KEF)	Esferas menores sem CaCl_2	72

Dentre as diferentes proporções das matrizes utilizadas, a relação 1:1:1 de enzima-alginato-kefiran (ENZ:ALG:KEF) da amostra 7 (Tabela 4.2) apresentou um rendimento de imobilização de 75%. As esferas foram armazenadas sob refrigeração (em água destilada). As mesmas esferas armazenadas em solução de CaCl_2 apresentaram um rendimento de imobilização de 38% (amostra 1). Tal fato provavelmente esteja relacionado com alterações das matrizes esféricas de ALG-KEF em presença de CaCl_2 , já que todas as amostras cujas esferas foram conservadas nesta solução, apresentaram baixos rendimentos de imobilização, ou seja, por volta de 38-39% (Amostras 1, 3 e 6). Ainda, é possível destacar o efeito positivo do Kefiran sobre o rendimento de imobilização da α -amilase, uma vez que as maiores concentrações dos polissacarídeos promoveram mais altos rendimentos de imobilização 67 a 75% (Amostras 2, 4, 5, 7 e 9).

Estudos realizados por Jadhav et al. (2014) com o polissacarídeo pululano, complexado com a enzima α -amilase, a qual foi imobilizada em esferas de alginato de sódio, apresentaram rendimento de imobilização de 85% (α -amilase), enquanto a mesma enzima imobilizada somente com alginato de sódio apresentou um rendimento de imobilização de apenas 25%. Nawaz et al. (2015) mostraram que a imobilização de maltase de *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB4 por alginato de sódio

preservou 45% da atividade enzimática. Matrizes compostas por gelatina e glutaraldeído foram utilizadas para imobilização de α -amilase com retenção de 82,5% da atividade (JAISWAL et al., 2012). Estudos mostram que α -amilases imobilizadas em quitosana apresentaram retenção da atividade acima de 60% quando armazenadas a 4 °C durante 30 dias (RANA et al., 2014).

3.1.2 Determinação da estabilidade de α -amilase imobilizada

A Figura 3 apresenta o resultado da estabilidade enzimática residual para α -amilase imobilizada por envolvimento em diferentes proporções de matrizes de Alginato-Kefiran e conservadas de diferentes maneiras (em água destilada ou CaCl_2).

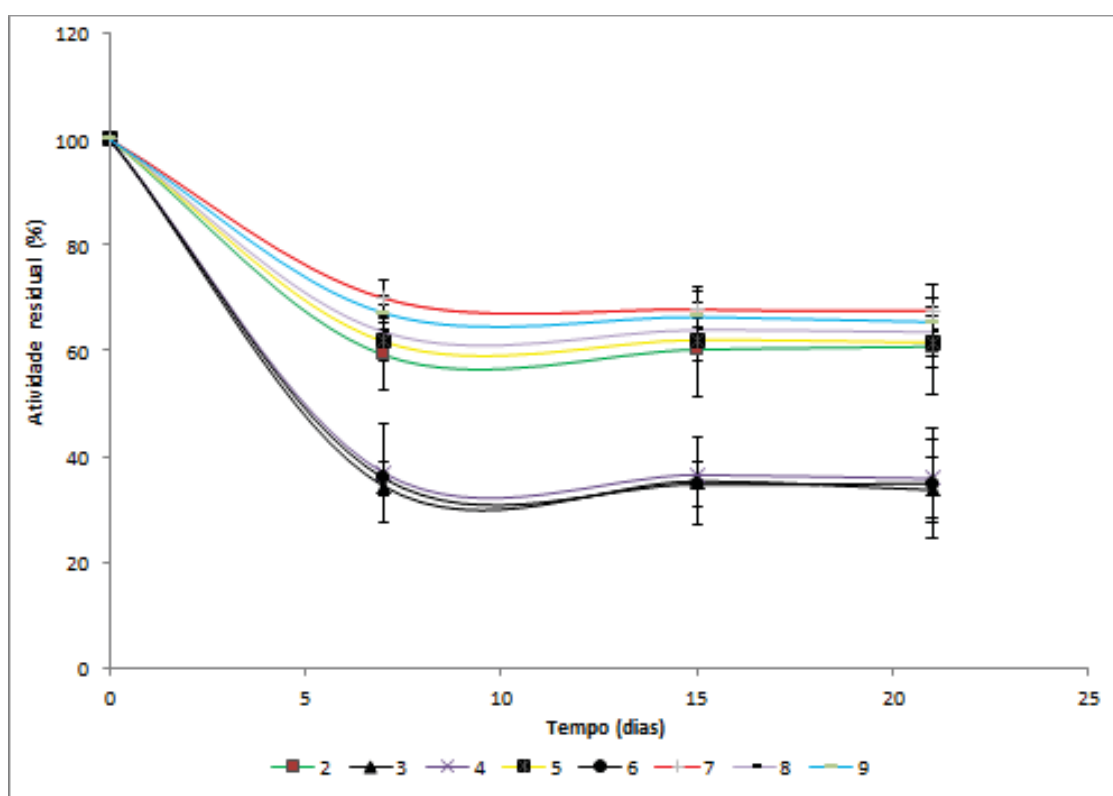


FIGURA 4.3. ESTABILIDADE ENZIMÁTICA PARA AMOSTRAS DE α -AMILASE IMOBILIZADA POR ENVOLVIMENTO COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE POLISSACARÍDEOS (ALGINATO-KEFIRAN), TAMANHO DE PARTÍCULAS, E MODOS DE CONSERVAÇÃO.

Na Figura 4.3, pode-se verificar que a imobilização por envolvimento com o uso dos polissacarídeos alginato de sódio e kefiran promoveu uma excelente interação com a enzima α -amilase. Na proporção 1:1 e 1:2 de alginato-kefiran, a atividade residual foi de 67,56% e 68,50%, respectivamente, ao longo de 21 dias para microesferas de tamanho menor com 3,75 mm de diâmetro (amostras 7 e 9 da Tabela 4.2).

As demais amostras apresentaram percentuais menores de estabilidade enzimática. As amostras conservadas em solução de CaCl_2 também mostraram menor estabilidade chegando a 33,68% em relação à atividade da enzima livre. Konsula et al. (2006) obtiveram 90% da atividade inicial da α -amilase após 5 ciclos, enquanto a enzima livre declinou após o segundo uso. Estudos mostram alfa-amilase imobilizadas pelo método covalente com retenção de 65% da sua atividade inicial, mesmo após 10 ciclos de uso (GASHTASBI et al., 2014). A alfa-amilase de soja foi imobilizada em duas matrizes de quitosana e Amberlite MB-150. A imobilização máxima de 62% e 70,4% foi obtida com quitosana e Amberlite MB-150, respectivamente. A enzima imobilizada mostrou uma alta estabilidade operacional ao reter 38% (para quitosana) e 58% (para Amberlite) da atividade inicial após 10 usos (KUMARI et al., 2011).

3.1.3. Determinação dos ciclos de re-utilização da α -amilase imobilizada

Uma vez determinada a melhor concentração de polissacarídeos alginato-kefiran e o tamanho das microesferas de 3,75 mm para a imobilização de α -amilase por envolvimento, fez-se o estudo da re-utilização das microesferas. Na Figura 4.4 é possível observar o comportamento das enzimas imobilizadas em diferentes ciclos de reutilização. Foram testadas neste caso amostras de α -amilase imobilizada por envolvimento em matrizes de alginato (E-A), enzima-alginato-kefiran (E+A+K) 1:1:1, enzima-alginato-kefiran (E+2A+K) e 1:K+2K).

As interações entre os polissacarídeos foram analisadas quanto à sua performance durante os ciclos de reutilização e comparadas à enzima livre. A amostra imobilizada apenas com alginato de sódio (E-A) apresentou 54,1% de atividade residual. A interação enzima – alginato - kefiran na proporção 1:1:1

apresentou 70,33% de atividade residual e na proporção 1:1:2 apresentou 69,49%. Tal fato demonstra que a matriz alginato-kefiran, nestas proporções, foi eficaz na manutenção da atividade enzimática.

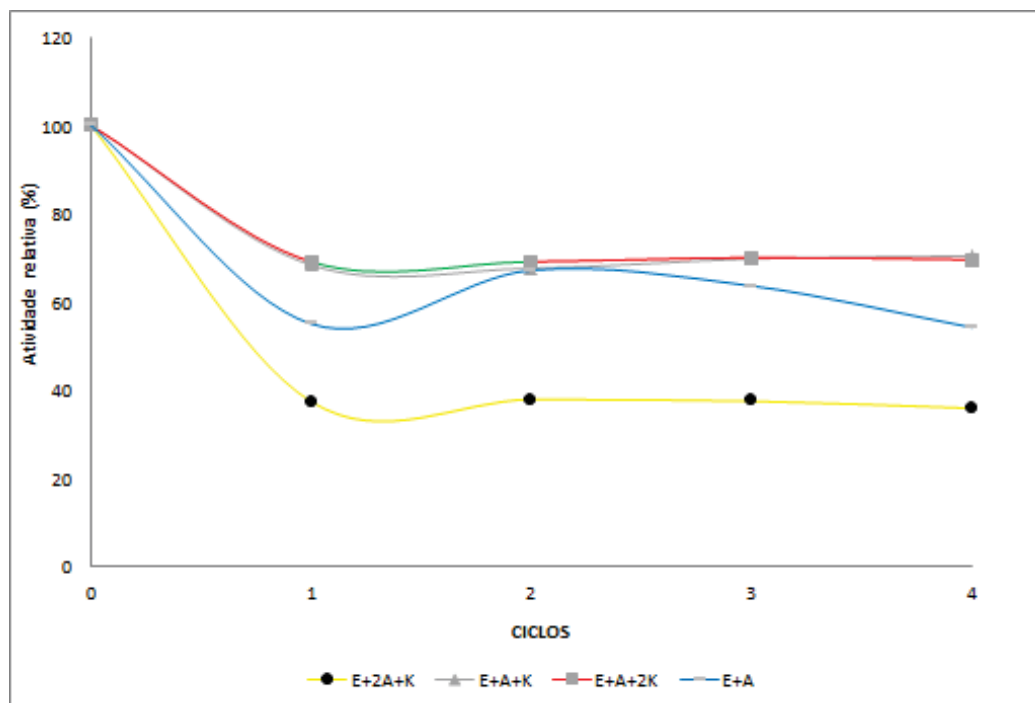


FIGURA 4.4. CICLOS DE REUTILIZAÇÃO DE α -AMILASE IMOBILIZADA EM MATRIZES DE ALGINATO (E-A) e ALGINATO-KEFIRAN (E+A+K, E+A+2K e E+2A+K)

3.1.4. Determinação da temperatura e do pH ótimos da α -amilase livre e imobilizada

A atividade enzimática da α -amilase livre e imobilizada em matrizes de alginato-kefiran em diferentes temperaturas (20 a 80°C) pode ser observada na Figura 4.5. A temperatura ótima da enzima livre foi de 40°C. Já a α -amilase imobilizada apresenta temperaturas ótimas de 50°C e 60°C, mostrando um aumento de sua termo estabilidade, fato este evidenciado pelos valores de atividade relativa de 96% e 98,72% respectivamente.

Estudos indicam que microesferas contendo pululano juntamente com enzimas são mais estáveis contra a desnaturação em comparação com esferas de mistura de enzimas livres (AMINI, SOROURADDIN e RASHIDI, 2011). HOMAEI et al. (2015) mostraram que α -amilases imobilizadas com partículas de ouro tiveram sua estabilidade térmica aumentada de 50°C para 60°C e o seu pH ótimo foi

deslocado de 6 para 7 após imobilização. O processo de imobilização proporcionou um aumento significativo da estabilidade à temperatura e valores de pH extremos em relação à α -amilase livre. Segundo Nawaz et al. (2015), maltase imobilizada em alginato de cálcio mostrou máxima atividade relativa de 75% a 50°C, quando comparada a maltase livre com atividade relativa de 45% na mesma temperatura. Esta mudança na temperatura ótima pode ocorrer devido ao comprometimento das propriedades hidrofóbicas e interações das moléculas de enzima dentro da matriz que são melhoradas a uma temperatura mais elevada. Publicações anteriores revelam que a endo- β -1,4-xilanase imobilizada apresentou atividade relativa máxima a 60 ° C, representando aumento de temperatura de 10°C em comparação com a enzima livre (BIBI et al., 2015). O mesmo resultado foi relatado quando a endo (1-4) β -D-glucanase imobilizada dentro de matriz de agar-agar usando a mesma técnica onde a temperatura ótima foi deslocada de 60 ° C para 70 ° C após a imobilização (KARIM et al., 2015).

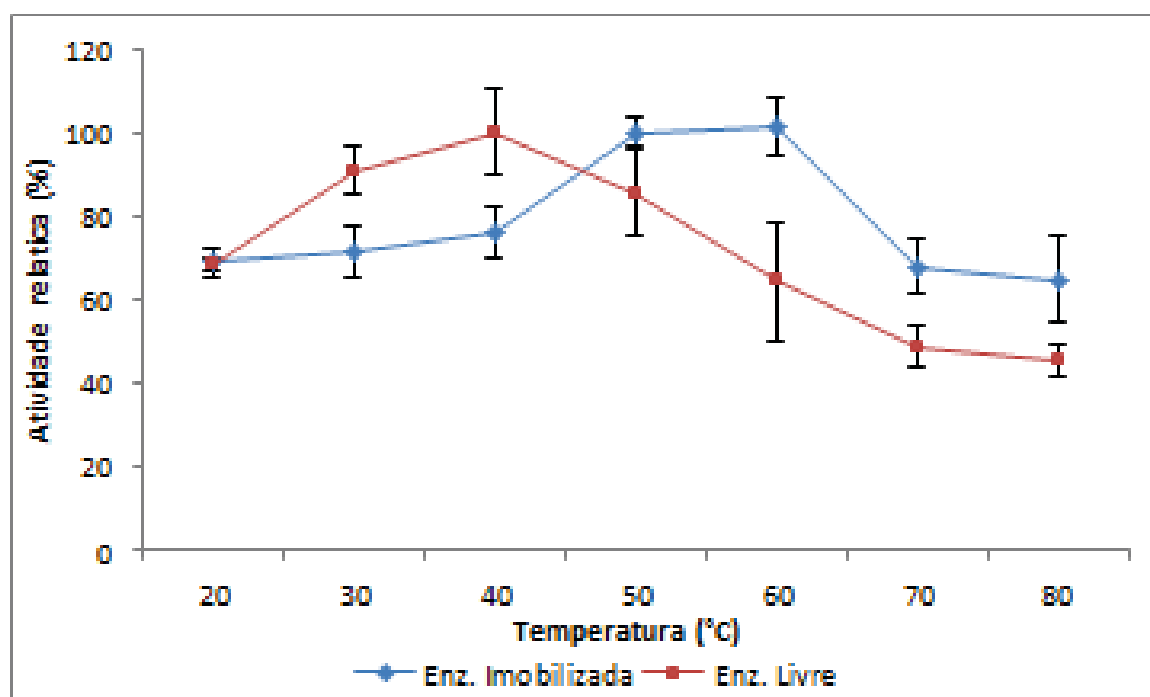


FIGURA 4.5. PERFIL DE TEMPERATURA DE REAÇÃO ENZIMÁTICA COM α -AMILASE LIVRE E IMOBILIZADA EM MICROESFERAS ALGINATO-KEFIRAN

O estudo de reação enzimática em diferentes pHs mostrou que a enzima imobilizada em microesferas de alginato-kefiran era mais estável em condições ácidas e alcalinas em comparação com a enzima livre (Figura 4.6). O pH ótimo para α -amilase livre e imobilizada é 7,0. A atividade residual da enzima livre em pH ácido de 3,5 e pH alcalino de 8,0 foi de 36,87% e 83,21%, respectivamente. A enzima imobilizada apresentou um valor de atividade residual de 17,48% e 78,22%, a pH 3,5 e pH 8,0, respectivamente.

A imobilização de lipase em alginato e matriz híbrida de κ -carragenina mostrou melhorar a estabilidade do pH (ABDULLA e RAVINDRA, 2013). Microesferas de alginato com enzimas imobilizadas com interação com pululano apresentaram melhor estabilidade em comparação com esferas de alginato sem pululano. Assim, o pululano pode ajudar a manter as moléculas de enzima na estrutura terciária dando rigidez à molécula. O agrupamento molecular criado pelo polissacarídeo pode ser responsável pela manutenção da estrutura terciária compacta da enzima no extremo ácido e alcalino (JADHAV et al., 2014).

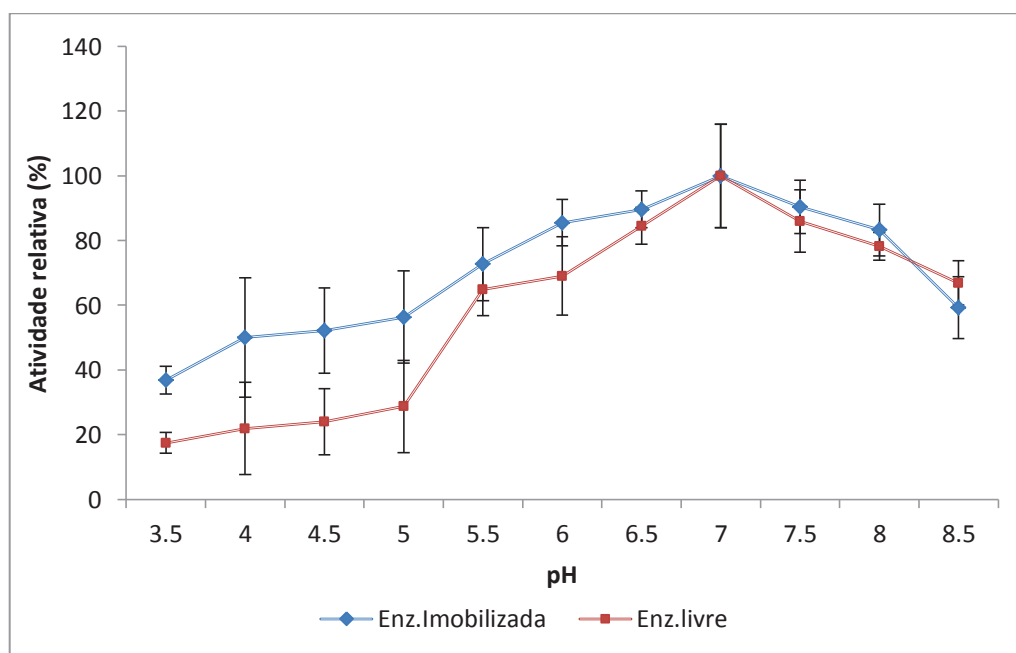


FIGURA 4.6. PERFIL DE pH DE REAÇÃO ENZIMÁTICA COM α -AMILASE LIVRE E IMOBILIZADA EM MICROESFERAS ALGINATO-KEFIRAN

3.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE MICROESFERAS DE α -AMILASE IMOBILIZADA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A Figura 4.7 apresenta as micrografias obtidas após análise em MEV para visualização da morfologia superficial ou topológica das amostras de microesferas de α -amilase imobilizada por envolvimento em alginato de sódio (ALG) ou alginato de sódio-kefiran (ALG-KEF).

A Figura 4.7 (a) e (b) mostram um tipo de estrutura alveolar que é atribuída à matriz de alginato ALG, apoiando a enzima α -amilase, a qual apresenta estrutura ovalada. O envolvimento da enzima com a matriz alginato-kefiran (ALG-KEF) é mostrado na Figura 4.7 (c) e (d). Neste caso, percebe-se que a presença do kefiran cria um revestimento da estrutura enzimática, parecendo formar uma película de forma a proteger a enzima de maneira mais eficiente. Na Figura 4.7 (e) e (f), onde é visualizada a amostra sem enzima imobilizada, observa-se uma superfície lisa sem a presença das estruturas protéicas características ALG/KEF.

Segundo Jadhav et al. (2014), a presença de polissacarídeos promove a interação não-covalente entre este e a enzima, sendo um método de estabilização simples e que leva a uma ótima retenção da enzima nas esferas de imobilização.

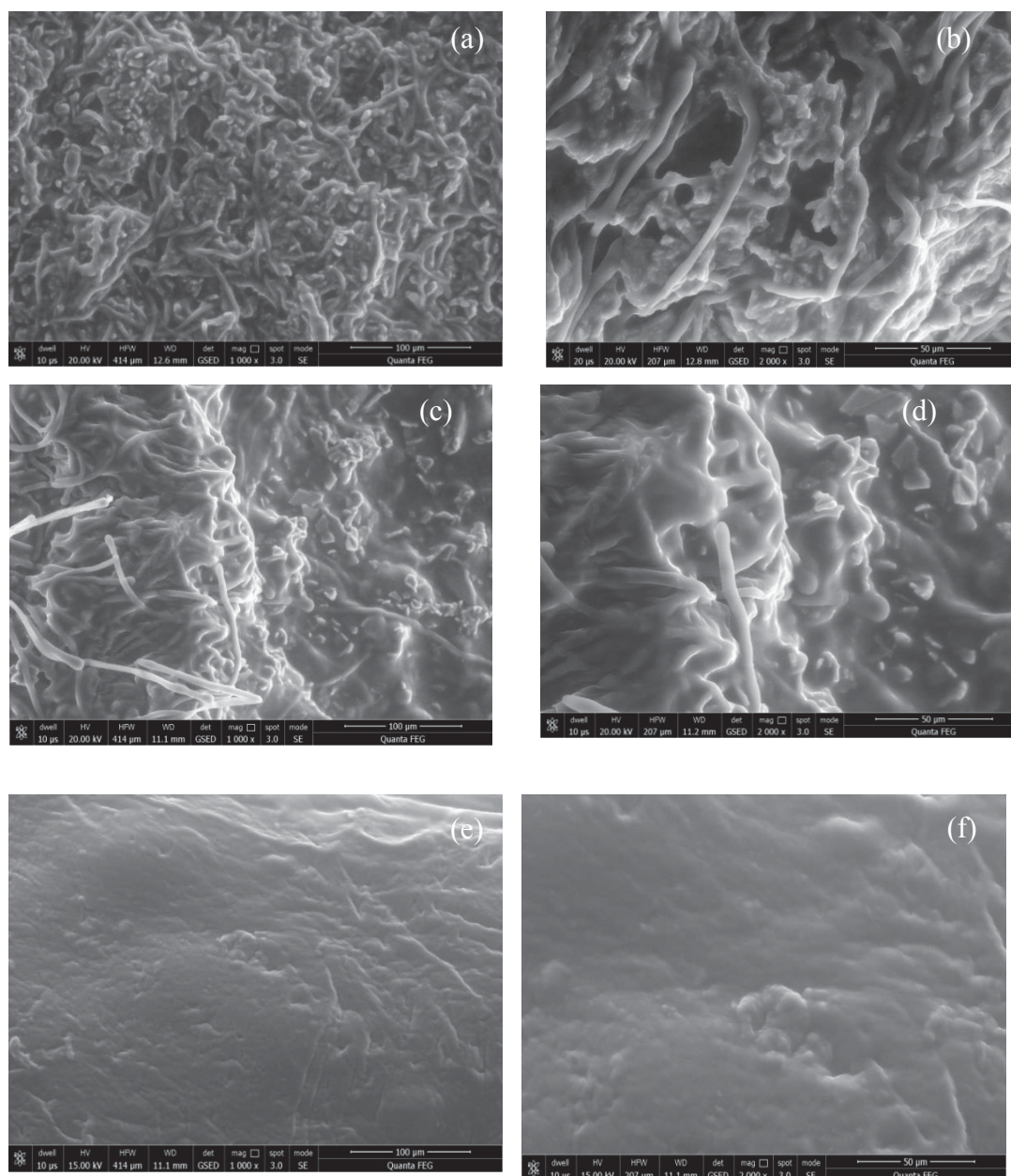


FIGURA 4.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – IMAGENS DAS MICROESFERAS COMPOSTAS POR: ALGINATO-ENZIMA 1000 X (A) 2000 X (B); ALGINATO-KEFIRAN-ENZIMA 1000 X (C) 2000 X (D); ALGINATO-KEFIRAN 1000 X (E) 2000 X (F)

3.3 ANÁLISE DE MICROESFERAS DE α -AMILASE IMOBILIZADA POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO TRANSFORMADA POR FOURIER (FTIR)

Nas Figuras 4.8 e 4.9 são apresentados os espectros de FTIR das amostras da enzima α -amilase livre, microesfera de alginato (ALG), microesfera de kefiran (KEF), microesfera de alginato com α -amilase imobilizada (ALG-ENZ) (proporção 1: 1), microesfera de alginato-kefiran razão 1: 1 (ALG-KEF) e microesfera de alginato-kefiran com α -amilase imobilizada (ALG-KEF-ENZ) (proporção 1: 1: 1).

Na Figura 4.8 pode-se observar que o espectro apresenta bandas de absorção características de alginato em 1604 cm^{-1} (vibração de estiramento assimétrica do grupo carbonila), 1431 cm^{-1} (vibração de estiramento simétrica do grupo carboxila) e um pico largo entre 3298 cm^{-1} e 3596 cm^{-1} característico de grupo hidroxila presente no espectro de kefiran, associado a estruturas de polissacarídeo (HUANG et al., 2015; LI et al., 2015; MOHY ELDIN et al., 2015). O espectro de kefiran mostra um pico de estiramento em 2929 cm^{-1} devido à presença de grupos metila, podendo ser atribuído aos picos de 1641 cm^{-1} e 1041 cm^{-1} tendo vibrações do anel sobrepostas com vibrações de alongamento dos grupos laterais (C-OH) e (C-O-C) e vibração da banda glicosídica, que são características de cada polissacarídeo (SEMENIUC, 2013). Finalmente, as bandas de vibração em torno de 902 cm^{-1} no espectro de kefiran indicam a presença de ligações β -glicosídicas (CHEN et al., 2015).

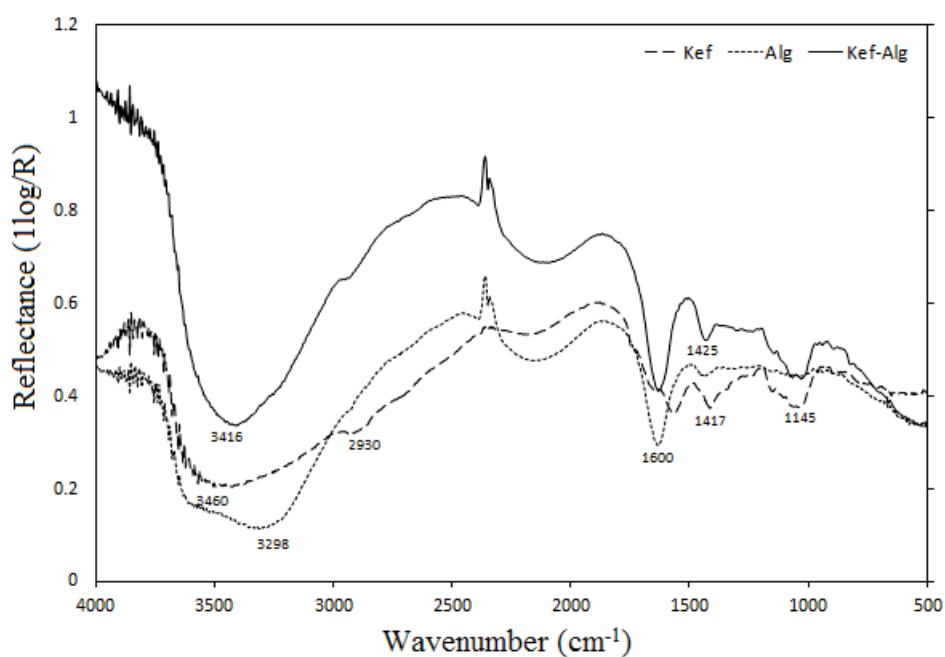


FIGURA 4.8. ESPECTRO DE FTIR DE ALGINATO (ALG), KEFIRAN (KEF) E DA MISTURA KEFIRAN-ALGINATO (ALG-KEF) NA RAZÃO DE 1:1

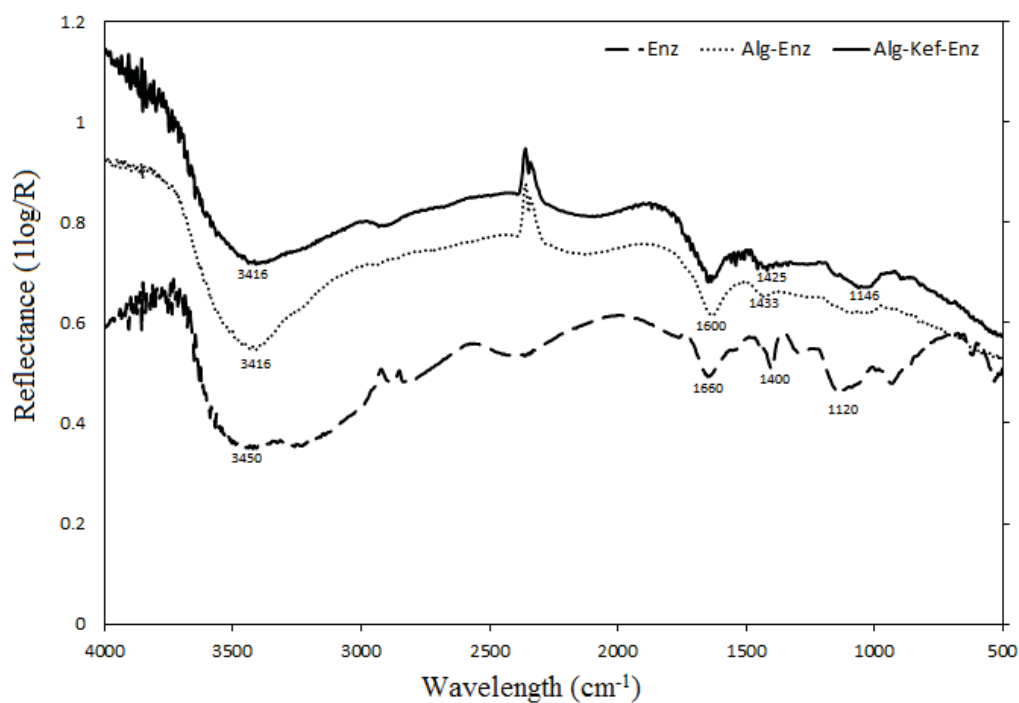


FIGURA 4.9. ESPECTRO DE FTIR DE ENZIMA (ENZ), ALGINATO-ENZIMA (ALG-ENZ) NA RAZÃO de 1:1, ALGINATO-KEFIRAN-ENZIMA (ALG-KEF-ENZ) NA RAZÃO DE 1:1:1

O espectro da enzima α -amilase mostra um pico largo ao redor de 3450 que está associado com mudanças nos trechos de grupos comuns álcool (OH) e aminas (NH) na estrutura enzimática (SHUKLA e SINGH, 2016), e outros picos por volta de 1660 (α -hélice de amida I), 1400 (NH em modo de dobra plana) e 1120 (anel imidazol da histidina) (NADAR et al., 2016; SHUKLA e SINGH, 2015).

TABELA 4.3. POSIÇÕES DAS BANDAS FTIR (cm^{-1}) E ATRIBUIÇÕES PARA ALG, KEF, ALG-ENZ (RAZÃO 1: 1), ALG-KEF (RAZÃO 1: 1), ALG-KEF- ENZ) FORMULAÇÕES.

Wavenumbers (cm^{-1})						Attributions
Enz	Kef	Alg	Alg-Enz	Alg-Enz-Kef	Alg-Kef	
3450						changes in the stretches of alcohol (OH) and amines (NH)
	3462,08		3416,79	3415,79	3415,79	O-H, stretching vibrations and hydrogen bonding
		3298,14				OH, axial deformation
	2929,75	-	-	2904,79	-	C-H, stretching vibrations
	1641,35	1604,71	1601,71	1601,71	1601,71	C=O, stretching vibrations
1660						α -helix of amide I
	1560,34	-	-	-	-	C=O, free stretching vibrations (asymmetric and symmetric)
1400						N-H in plane bending mode
	1417,62	1431,13	1433,05	1423,40	1425,33	O-H bending
1120						imidazole ring of the His-tidine side chain
	1149,52	-	-	1151,45	1145,67	C-O-C, stretching vibrations
	1041,51					C-O, stretching vibrations
	902,64	-	-	-		CH bending

FONTE: O autor (2016).

O espectro de microesferas de Alginato-Kefiran apresenta novos picos de cerca de 902 cm^{-1} e 1041 cm^{-1} que indicam a presença do polímero na rede de alginato, sugerindo a formação de uma matriz estável em concordância com outros estudos (BLANDÓN et al., 2016). Por outro lado, a ausência de novas bandas no espectro de alginato-enzima, alginato-kefiran-enzima sugerem nenhuma interação química indicando a preservação da atividade enzimática.

3.4 ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS DE MICROESFERAS DE α -AMILASE IMOBILIZADA

As propriedades térmicas da enzima, alginato, alginato-enzima, alginato-kefiran e alginato-kefiran-enzima foram determinadas (Figura 4.10). As interações alginato-enzima, alginato-kefiran, alginato-kefiran tornam-se mais estáveis em temperaturas acima de 300°C, sugerindo que Kefiran e alginato forneceram alguma proteção à enzima por degradação térmica.

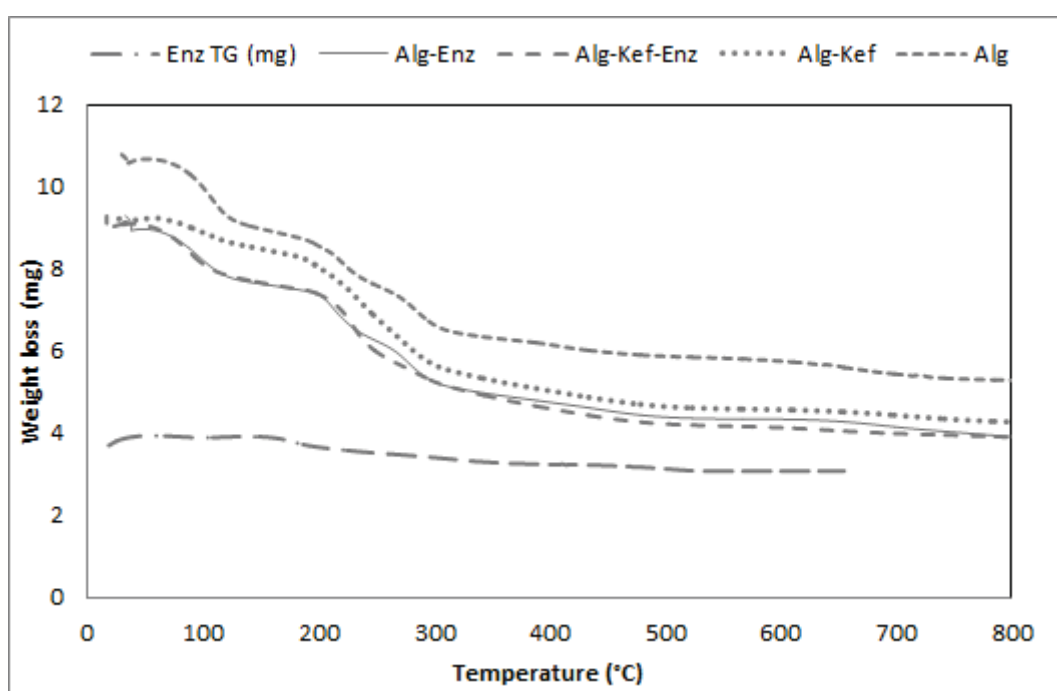


FIGURA 4.10. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) DE AMOSTRAS DE α -AMILASE IMOBILIZADA EM MATRIZES DE ALGINATO (ALG-ENZ), ALGINATO-KEFIRAN (ALG-KEF-ENZ), ENZIMA LIVRE (ENZ TG), ALGINATO-KEFIRAN (ALG-KEF) E ALGINATO (ALG).

Na Tabela 4.4 pode-se observar os principais eventos térmicos para as amostras de enzima, alginato, kefiran, alginato-kefiran, alginato-kefiran-enzima. As microesferas de alginato reticulado com cálcio apresentaram decomposição em três estágios, com o primeiro evento associado à evaporação seguido de desidratação, o segundo devido à degradação do alginato de sódio ao carbonato de sódio (Na_2CO_3), e o terceiro à decomposição do carbonato de sódio e óxido de sódio (Na_2O).

(VELINGS et al., 1995). Nesta linha de raciocínio pode ser observado que as amostras em que o alginato está presente são eventos registrados a temperaturas semelhantes, perda de água entre 50 e 100 ° C e a formação de carbonatos a 222 ° C e a formação de óxido de cálcio a 279 ° C até 403 ° C. O alginato de sódio se decompõe por desidratação e degradação em Na₂CO₃ (SOARES SANTOS, CHIERICE e KNIGHT, 2004).

TABELA 4.4. EVENTOS TÉRMICOS DA ANÁLISE TGA DE AMOSTRAS DE ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA POR ENVOLVIMENTO EM DIFERENTES MATRIZES.

Amostra	Eventos	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)
Enz	1º	87	3,91
	2º	177	3,8
	3º	507	3,12
Alg	1º	99	10
	2º	222	8,12
	3º	279	7,13
Kef	1º	300	6,98
Alg-Kef	1º	81	9
	2º	233	7,3
	3º	277	6,14
Alg-Kef-Enz	1º	81	8,6
	2º	230	6,62
	3º	275	5,61
Alg-Enz	1º	89	8,48
	2º	211	7,11
	3º	276	5,77

Siglas: Enz: enzima livre; Alg: alginato, Kef: kefir; Alg-Kef: Alginato e Kefiran; Alg-Kef-Enz: enzima imobilizada em matriz de alginato e kefir 1:1, Alg-Enz: enzima imobilizada em matriz de alginato

A análise termogravimétrica indicou que as amostras híbridas, ou seja, compostas por mais de um componente da matriz são termicamente estáveis. A perda de massa na primeira fase é definida entre 24% e 28% e ocorreu até 100 °C e pode ser atribuída à perda de água livre. Na segunda fase há perda de 4,5% a 11% em massa, a qual pode ser atribuída à perda de água ligada. Sabe-se que os

polissacarídeos têm uma forte afinidade para a hidratação da água e suas propriedades dependem de suas estruturas primárias e supramoleculares (CHAPLIN, 2008; DESPOND et al. 2005; KITTUR et al. 2002) e também da formação de carbonatos que ocorreu até 233°C. No terceiro caso que é o processo de decomposição, ocorre a perda de massa entre 38% e 39,5% a 275°C, que é atribuída à formação de óxidos e outras substâncias inorgânicas.

4 CONCLUSÃO

A α -amilase envolvida em matrizes de alginato de sódio - kefiran mostrou um rendimento de imobilização bom (75%). A atividade enzimática da enzima imobilizada foi determinada como ótima a 50 °C e 60 °C de temperatura, se comparada a enzima livre cuja temperatura ótima era de 40°C. Tal fato demonstra que a imobilização tornou a enzima mais termo estável. As microesferas também mostraram maior estabilidade a pH entre 3,5 e 6,5 em relação à enzima livre. Além disso, a imobilização utilizando o complexo alginato de sódio – kefiran permitiu a reutilização das microesferas alcançando 70,33% de atividade residual ao final do 5º ciclo de reutilização.

Este estudo justifica o uso da matriz de alginato de sódio e kefiran como suporte apropriado para a imobilização da α -amilase por meio da técnica de envolvimento. A enzima imobilizada apresentou notável estabilidade térmica e eficiência na reutilização. Além dos parâmetros da α -amilase terem sido melhorados após a imobilização, é possível sugerir que ocorreu uma boa biocompatibilidade desta na matriz de alginato de sódio e kefiran. Tal eficiência catalítica da α -amilase imobilizada é de extrema importância para diversas aplicações industriais.

5 REFERÊNCIAS

- ARPANA KUMARI, ARVIND M. KAYASTHA. Immobilization of soybean (Glycine max) α -amylase onto Chitosan and AmberliteMB-150 beads: Optimization and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 69 (2011) 8–14
- A.KARIM, S.A.U. QADER, A. NAWAZ, A. AMAN. Immobilization of Endo (1→4) β -D-Glucanase from *Bacillus Licheniformis* KIBGE-IB2 Using Agar-Agar as Support for Continuous Use. **Chem. Eng. Trans.** 38 (2014) 409–414.
- AHMAD HOMAEI, DARIUSH SABERI. Immobilization of α -amylase on gold nanorods: An ideal system for starch processing. **Process Biochemistry**. Volume 50, Issue 9, September 2015, Pages 1394–1399
- AMINI, K., SOROURADDIN, M.H., RASHIDI, M.R., 2011. Activity and stability of rat liver xanthine oxidase in the presence of pyridine. **Can. J. Chem.** 89, 1–7.
- A. RIAZ, S.A.U. QADER, A. ANWAR, S. IQBAL, **Aust. J. Basic Appl. Sci.** 3 (2009) 2883–2887.
- BOTELHO, P. S., MACIEL, M. I., BUENO, L. A., MARQUES MDE, F., MARQUES, D. N., AND SARMENTO SILVA, T. M. (2014). Characterization of a new exopolysaccharide obtained from of fermented kefir grains in soy milk. **Carbohydr.Polym.** 107,1–6. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.02.036
- CARNEIRO RP. M.Sc. Dissertation. Belo Horizonte, Brasil: Faculdade de Farmácia. UFMG; 2010.
- C. MATEO, J.M. PALOMO, G. FERNANDEZ-LORENTE, J.M. GUIBAN, R. FERNANDEZ-LAFUENTE, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity techniques, **Enzyme Microb.Technol.** 40 (2007) 1451–1463.
- CRISTINA ANAMARIA SEMENIUC, ANCUȚA ROTAR, LAURA STAN, CARMEN RODICA POP, SONIA SOCACI, VIOARA MIREȘAN & SEVASTIȚA MUSTE. Characterization of pine bud syrup and its effect on physicochemical and sensory properties of kefir. **CyTA - Journal of Food**. Pages 213-218. (2015).
- DESPOND, S., ESPUCHE, N., CARTIER, N., AND DOMARD, A. (2005). “Barrier properties of paper-chitosan and paper-chitosan-carnauba wax films,” **J. Appl. Polym. Sci.** 98(2), 704-710.
- DINIZ RO, GARLA LK, SCHNEEDORF JM, CARVALHO JC. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. **Pharmacol Res.** 2003 Jan ; 47(1) :49-52.

FARNWORTH ER, MAINVILLE I. Kefir - A Fermented Milk Product. In: Farnworth ER, editor. Handbook of Fermented Functional Foods. 2th ed. **CRC Press Taylor & Francis Group; Boca Raton, London, New York**: 2008. pp. 89–127. (2 ed)

GUPTA MN, RAGHAVA S. Enzyme stabilization via cross-linked enzyme aggregates. In: Shelley DM, editor. Enzyme stabilization and immobilization: methods and protocols, methods in molecular biology. **NewYork: Springer Science Business Media, LLC**; 2011. p. 133–45.

GARROTE GL, ABRAHAM AG, DE ANTONI G. Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. In: Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM, editors. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria - Novel Applications. Iowa: Blackwell Publishing**; 2010. pp. 327–340.

HL CHEN , YT TUNG , CH CHUANG , ET AL. (2015) Kefir improves bone mass and microarchitecture in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. **Osteoporos Int** 26, 589–599.

HUANG, Y.,WU, F., WANG,X., SUI, Y.,YANG, L.,& WANG, J.(2013).Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: A potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. **Journal of Dairy Science**, 96, 2816–2825.

H.U. REHMAN, A. AMAN, A. SILIPO, S.A.U. QADER, A. MOLINARO, A. ANSARI, **Food Chem.** 139 (2013) 1081–1086.

FATEMEHGASHTASBI,GHOLAMREZAAHMADIAN*,KAMBIZAKBARINOUGHABI. Newinsightsintotheeffectivenessofalpha-amylaseenzyme presentationonthe*Bacillus subtilis*sporesurfacebyadsorptionandcovalentimmobilization. **Enzyme and Microbial Technology**64–65(2014)17–23

IPSITA ROY, M. S. R. SASTRY, B. N. JOHRI AND MUNISHWAR N. GUPTA. Purification of α -Amylase Isoenzymes from *Scytalidium thermophilum* on a Fluidized Bed of Alginate Beads Followed by Concanavalin A–Agarose Column Chromatography. **Protein Expression and Purification** 20, 162–168 (2000).

KING, V. A. E AND R. R. ZALL 1983a. Ethanol fermentation of whey using polyacrylamide and kappa-carrageenan entrapped yeasts. **Journal of General Applied Microbiology** 29. 379-93.

KING, V. A. E AND R. R. ZALL 1983b. Ethanol fermentation of whey using calcium alginate entrapped yeasts. **Process Biochemistry** (December), 17-20.

KUMARI A, KAYASTHA AM (2011). Immobilization of soybean (Glycine max) α -amylase onto chitosan and amberlite MB-150 beads: optimization and characterization. **J Mol Catal B-Enzym** 69:8–14.

LE-TIEN, C. MILLETTE M, MATEESCU MA AND LACROIX M (2004). Modified alginate and chitosan for lactic acid bacteria immobilization. **Biotechnol Appl Biochem**, 39, 347-354.

LINA M. BLANDÓN, GERMAN A. ISLAN, GUILLERMO R. CASTRO, MIGUEL D. NOSEDA, VANETE THOMAZ-SOCCOL, CARLOS R. SOCCOL. Kefiran-alginate gel microspheres for oral delivery of ciprofloxacin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Volume 145, 1 September 2016, Pages 706–715.

LI C, LI W, CHEN X, FENG M, RUI X, JIANG M, DONG M (2014) Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. **LWT-Food Sci Technol** 57(2):477–485.

LI Y., LIU T.-J., HE G.-Q. (2015). Antioxidant activity of peptides from fermented milk with mix culture of lactic acid bacteria and yeast. **Adv. J. Food Sci. Technol.** 7 422–427.

LOPITZ-OTSOA F, REMENTERIA A, ELGUEZABAL N, GARAIZAR J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Rev Iberoam Micol.** 2006;23:67–74. [PubMed]

L. WILSON, J.M. PALOMO, G. FERNÁNDEZ-LORENTE, A. ILLANES, J.M. GUISÁN, R. FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from *alcaligenes* sp. Via strong adsorption on hydrophobic supports, **Enzyme Microb. Technol.** 38 (2006) 975–980.

MOE ST, DRAGET KI, SKJAK-BRAEK G, ET AL. Alginates. In: Stephen AM, editor. Food polysaccharides and their applications. **New York: Marcel Dekker;** 1995. pp. 245–86.

HIROAKI MAEDA, XIA ZHU, KAZUNOBU OMURA, SHIHO SUZUKI AND SHINICHI KITAMURA. Effects of an exopolysaccharide (kefir) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. **BioFactors** 22(2004)197–200

M.S. MOHY ELDIN, Y.A. AGGOUR, M.R. EL-AASSAR, G.E. BEGHET & R.R. ATTA. Development of nano-crosslinked polyacrylonitrile ions exchanger particles for dyes removal. **Desalination and Water Treatment**. Pages 4255-4266 – 2015.

MARIA R. PRADO, LINA MARCELA BLANDÓN, LUCIANA P. S. VANDENBERGHE, CRISTINE RODRIGUES, GUILLERMO R. CASTRO, VANETE THOMAZ-SOCCOL AND CARLOS R. SOCCOL. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in Microbiology**. 30 October 2015.

MILLER GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem** 31:426–429.

MUHAMMAD ASIF NAWAZ, HANEEF UR REHMAN, ZAINAB BIBI, AFSHEEN AMAN, SHAH ALI UL QADER. Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix. **Biochemistry and Biophysics Reports** 4 (2015) 250–256

MAGALHÃES KT, PEREIRA GVM, DIAS DR, SCHWAN RF. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World J Microbiol Biotechnol.** 2010a;26:1241–1250.[PubMed].

MEDHA RANA, AMITA KUMARI, GHANSHYAM S. CHAUHAN, KALPANA CHAUHAN. Modified chitosan microspheres in non-aggregated amylase immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules** Volume 66, May 2014, Pages 46–51.

NIVEDITA JAISWAL, OM PRAKASH, MAHE TALAT, S.H. HASAN, RAJESH KUMAR PANDEY. α -Amylase immobilization on gelatin: Optimization of process variables. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** Volume 10, Issue 1, June 2012, Pages 161–167

PRADO MR, BLANDÓN LM, VANDENBERGHE LPS, RODRIGUES C, CASTRO GR, THOMAZ-SOCCOL V AND SOCCOL CR (2015) Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Front. Microbiol.** 6:1177. doi: 10.3389/fmicb.2015.01177

RAHMATH ABDULLA, POGAKU RAVINDRA. Immobilized *Burkholderia cepacia* lipase for biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. oil. **Biomass and Bioenergy.** Volume 56, September 2013, Pages 8–13.

RIMADA, P. S., & ABRAHAM, A. G. (2003) Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey. **Lait**, 83(1), 79-87.

RUSHIT J. SHUKLA, SATYA P. SINGH. Structural and catalytic properties of immobilized α -amylase from *Laceyella sacchari* TSI-2. **International Journal of Biological Macromolecules.** Volume 85, April 2016, Pages 208–216.

RATTRAY FP, O'CONNELL MJ. Fermented Milks Kefir. In: Fukay JW, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences. 2th ed. **Academic Press; San Diego, USA:** 2011. pp. 518–524.

REA MC, LENNARTSSON T, DILLON P, DRINA FD, REVILLE WJ, HEAPES M, COGAN TM. Irish kefir-like grains : their structure, microbial composition and fermentation kinetics. **J Appl Microbiol.** 1996;8:83–94.

SEYHAN F, TIJSKENS L M M AND EVRANUZ O (2002) Modeling temperature and pH dependence of lipase and peroxidase activity in Turkish hazelnuts. **Journal of Food Engineering** 52: 387–395.

SWATI B. JADHAV, REKHA S. SINGHA. Pullulan-complexed α -amylase and glucosidase in alginate beads: Enhanced entrapment and stability. **Carbohydrate Polymers**. Vol.105, (2014), p. 49–56

SMIDSROD O, SKJAK-BRAEK G (1990). Alginate for cell immobilization. **Trends in Food Sci Technol**. 8: 71-75.

SATAR R, MATTO M, HUSAIN Q. (2008) Studies on calcium alginate–pectin gel entrapped concanavalin A–bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase complex. **J Sci Ind Res India** 67:609–615.

TURBIANI, F. R. B. e KIECKBUSCH, T. G. Mechanical and barrier properties of sodium alginate films obtained using calcium benzoate and/or calcium chloride as the crosslinking agente. **Braz. J. Food Technol., Campinas**, v. 14, n. 2, p. 82-90, abr./jun. 2011.

TAPATI BHANJA, S. ROUT, RINTU BANERJEE, B. C. BHATTACHARYYA. Comparative profiles of α -amylase production in conventional tray reactor and GROWTEK bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 2007, Volume 30, Issue 5, pp 369–376.

TALEKAR, S., & CHAVARE, S. (2012). Optimization of immobilization of α -amylase in alginate gel and its comparative biochemical studies with free α -amylase. **Recent Research in Science and Technology**, 4(2), 1–5.

TAMIME AY. Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products. In: Tamime AY, editor. Fermented Milk. Blackwell Science Ltd; Oxford, UK: 2006. pp. 174–216. Farnworth ER. Kefir - a complex probiotic. **Food Sci Technol Bull: Functional Foods**. 2005;2:1–17.

WEE S, GOMBOTZ WR. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**.1998 May 4;31(3):267-285.

WANG, J., XIAO, Z., ZHENG, T., YANG, Y., & YANG, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet kefir. **Carbohydrate Polymers**, 125, 16–25.

WANG SY, HO YF, CHEN YP, CHEN MJ (2015). Effects of a novel encapsulating technique on the temperature tolerance and anti-colitis activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus kefirifaciens* M1. **Food Microbiol** 46:494–500.

VELINGS N. & MESTDAGH M., 1995. Physico-chemical properties of alginate gel beads. **Polym. Gels Networks**, 3, 311-330.

Z. BIBI, F. SHAHID, S.A.U. QADER, A. AMAN. Agar–agar entrapment increases the stability of endo- β -1,4-xylanase for repeated biodegradation of xylan. **Int. J. Biol. Macromol**. 75 (2015) 121–127

CAPÍTULO V. ESTUDOS DE APLICAÇÃO DA ENZIMA α -AMILASE NA INDÚSTRIA DE PANIFICAÇÃO

A indústria de panificação fez uso de enzimas amilases por centenas de anos para fabricar uma grande variedade de produtos de alta qualidade. Estas enzimas foram usadas em pães para proporcionar a estes produtos um volume mais alto, uma cor melhor e uma textura mais macia. São utilizadas α -amilases de cereais de malte de cevada e enzimas microbianas de fungos e bactérias.

Formulações líquida e em pó de α -amilase, produzida por *Aspergillus oryzae* LPB 5593 em FSm, foram aplicadas em panificação. As dosagens de aplicação da enzima líquida foram estabelecidas em concentrações de 40 ppm e 80 ppm e a enzima comercial (Alfa amilase Spring Alpha 140.000) foi aplicada na concentração de 20 ppm seguindo especificação técnica do fabricante. A aplicação em maior dosagem da formulação enzimática contendo α -amilase líquida (amostra LPB) não concentrada ocorreu em função da atividade amilolítica (768 U.mL^{-1}) ser inferior à atividade da enzima comercial (1390 U.mL^{-1}). A aplicação da formulação enzimática em pó foi realizada em duas dosagens diferentes, utilizando-se 20 ppm e 30 ppm para a amostra LPB e para a enzima comercial. Os resultados de aplicação das enzimas α -amilase em pó (amostra LPB), e a α -amilase comercial (Spring Alpha 140.000) mostram que as duas enzimas alcançaram desempenhos comparáveis quando avaliadas nas mesmas condições. De modo geral, quando submetida à avaliação comparativa a amostra α -amilase LPB apresentou resultados semelhantes à enzima comercial nos quesitos absorção, mistura, desenvolvimento, viscosidade, presença de α -amilase e retrogradação do amido. A atividade enzimática determinada em equipamento industrial *Falling Number* indicou que a amostra teste α -amilase LPB poderia ser aplicada em escala industrial. A avaliação foi realizada com formulação padrão, e os percentuais dos ingredientes foram iguais para as enzimas teste e comercial. Os resultados foram considerados bons, sendo a enzima α -amilase LPB uma alternativa com potencial de aplicação na indústria de panificação por alcançar desempenho comparável à amilase comercial.

Palavras-chave: α -amilase, formulação enzimática, amido, panificação.

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento do pão é um dos processos mais caros da deterioração do alimento. Para evitar este fenômeno, agentes antienvelhecimento, tais como enzimas e emulsificantes, são utilizados na fabricação de pão, uma vez que interferem com a reassociação de amilose, amilopectina ou ambos (PURHAGEN & ELIASSON, 2011). As enzimas mais frequentemente utilizadas são α -amilases de origem fúngica, microbiana ou de cereais (ROSELL et al., 2001).

O problema do envelhecimento do pão ou *staling* fez com que a indústria de panificação direcionasse suas pesquisas em alternativas para reduzir tal efeito. O envelhecimento é um processo complexo que começa logo após o cozimento e é definido como um termo que indica diminuição da aceitação dos produtos de panificação por parte dos consumidores, as inconsistências que não sejam as resultantes da ação de deterioração por organismos (GRAY e BEMILLER, 2003). O mecanismo do *staling* do pão envolve a re-cristalização, também conhecida na indústria como retrogradação de amido gelatinizado, responsável pela mudança de textura que ocorre durante o armazenamento do pão (GRAY e BEMILLER, 2003). A primeira pesquisa sobre *staling* foi relatada por Boussingault (1852), que mostrou que o mesmo não ocorre devido à perda de umidade pelo processo de secagem. Usando difração de raios X, Katz (1928) demonstrou que a cristalização de amilose e amilopectina era na verdade responsável pelo endurecimento do pão ao longo do tempo.

Os estudos de avaliação do ciclo de vida indicaram que a utilização ou o aumento do uso de enzimas antienvelhecimento na produção de pão pode levar a uma redução drástica do impacto ambiental (5,4 kg de CO₂ por 100 pães vendidos) (JEGANNATHAN & NIELSEN, 2013).

Para evitar este fenômeno, agentes antienvelhecimento tais como enzimas e emulsionantes são usados na panificação, pois interferem com a re-associação de amilose e amilopectina (PURHAGEN & ELIASSON, 2011). As amilases também são responsáveis pelo aumento da disponibilidade de açúcar fermentescível na massa, melhorando o paladar e a qualidade da tostagem do pão (VITOLLO, 2001; DAM, 1992). A aplicação das amilases tem sido vantajosa para redução de perdas em

processos de produção, por armazenamento, temperatura, luz e manuseio. As amilases têm como objetivo de aplicação a obtenção de volume, crocância, cor da casca do pão e maciez. De forma geral, as enzimas comerciais estão disponíveis em fórmulas bastante concentradas e os custos de aplicação podem ser acessíveis se houver uma dosagem adequada ao produto.

O objetivo deste trabalho foi aplicar a α -amilase LPB obtida por FSm em um processo de produção de pães visando avaliar sua atuação e benefícios no produto final.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DE α -AMILASE PARA OS ESTUDOS DE APLICAÇÃO

A enzima amilase foi obtida por FSm em condições otimizadas conforme descritas no capítulo II (item 2.4.2). Após processo fermentativo o extrato foi homogeneizado e filtrado em papel filtro Whatman nº 1, microfiltrado e ultrafiltrado em conjunto Pellicon 2 (Millipore) em cartuchos do tipo cassette de 30 kDa. O extrato enzimático concentrado foi submetido a processo de secagem por Spray Dryer e utilizado nos estudos de aplicação em formulação de pães na forma líquida e pó.

2.2 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DA α -AMILASE

A atividade da amilase foi determinada pela incubação de 0,5mL de amido (Synth) 1%(m/v), substrato padrão, em tampão fosfato de sódio pH 7 com 0,5mL do extrato enzimático diluído (JENSEN e OLSEN, 2003 e RAMESH e LONSANE, 1989). Após 10 minutos de incubação a 37°C foi adicionado 1 mL DNS e submetido a fervura em banho com agitação por 5 minutos e em seguida o conteúdo foi resfriado. Após resfriamento, foram acrescidos 3,5 mL de água destilada e o conteúdo homogeneizado. Os açúcares redutores foram determinados pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade necessária de enzima que hidrolisa amilase equivalente a 1 μ mol de maltose por minuto nas condições mencionadas.

2.3 ESTUDO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA α -AMILASE LÍQUIDA NA PRODUÇÃO DE PÃES

A enzima LPB produzida foi aplicada em dosagens de 0,004% e 0,008% (v/m), correspondendo a 0,002% (v/m) da enzima comercial (α -amilase fungica Spring alpha 140000) e o dobro da sua dosagem, respectivamente. As amostras foram aplicadas em formulação padrão de panificação, a qual contém farinha de trigo 100% (m/m), sal 2% (m/m), fermento biológico 1% (m/m), água 58% (m/m), ácido ascórbico 0,01% (m/m), azodicarbonamida 0,004% (m/m), enzimas 0,002% (m/m) e emulsificantes 0,105% (m/m).

2.4. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS ENZIMAS LPB E COMERCIALEM PÓ NA PRODUÇÃO DE PÃES

Primeiramente foram realizados no Laboratório da Empresa Granotec do Brasil testes comparativos de atividade enzimática em equipamento Falling Number, testes de mistura para avaliação da reologia em equipamento Mixolab e simulação de fermentação em reofermentômetro. Posteriormente, foram conduzidas aplicações das enzimas em pó amostra LPB e enzima comercial conforme Tabela 5.1.

TABELA 5.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS COM A ADIÇÃO DAS ENZIMAS

Amostra	Descrição
Branco	Farinha de trigo sem adição da enzima.
α -amilase LPB 20ppm	Farinha de trigo com adição de 20ppm da enzima α -amilase LPB.
Spring Alpha 20 ppm	Farinha de trigo com adição de 20ppm da enzima Spring Alpha 140.000.
α -amilase LPB 30ppm	Farinha de trigo com adição de 30ppm da enzima α -amilase LPB
Spring Alpha 30 ppm	Farinha de trigo com adição de 20ppm da enzima Spring Alpha 140.000.

A enzima comercial utilizada foi α -amilase (Spring Alpha 140000) produzida pela Novozymes e diluída na forma comercial pela Granotec do Brasil responsável pela distribuição. A composição da formulação utilizada para os testes de aplicação está apresentada nas Tabelas 5.8 e 5.9.

2.4.1. Falling Number Fungal

O método de número de queda é um ensaio viscosimétrico que envolve a rápida gelatinização de uma suspensão de farinha ou de farinha em água, por imersão num banho de água fervente, com subsequente medição da liquificação do amido por α -amilase (MARES et al., 2008). O equipamento Falling Number realiza a medida indireta da atividade da α amilase endógena do trigo, sendo o resultado expresso em segundos. Quanto menor o valor de Falling number maior é a atividade enzimática e, do inverso, quanto maior o valor de Falling number, menor a atividade enzimática (BARNES e BLAKENEY, 1974; MARES, 1987). Para valores altos de Falling number haverá dificuldade de fermentação do pão com um miolo duro e compacto e aparência pálida. Já com um valor excessivamente baixo a massa se torna pegajosa e difícil de trabalhar, com miolo gomoso e casca muito escura (QUAGLIA, 1991).

2.4.2. Mixolab

Mixolab®, do fabricante Chopin Technologies (Villeneuve-la-Garenne, França), é o equipamento mais recente utilizado para determinar a qualidade reológica da massa. Permite caracterizar o comportamento físico-químico da massa quando submetida à mistura e variação de temperatura (XHABIRI et al., 2013). O método Mixolab® assemelha-se à metodologia dos equipamentos farinógrafos, mixógrafos, extensógrafos ou alveógrafos, os quais simulam os passos do processo de panificação (STOENESCU et al., 2010). Os parâmetros de análise são interpretados da seguinte maneira:

Índice de absorção: Indica a capacidade de absorção de água da farinha de trigo, que está relacionada a composição da farinha, ou seja proteínas, amidos, fibras, entre outros. Quanto maior o índice, maior a absorção de água da farinha.

Índice de Mistura: O índice de mistura indica a resistência da massa ao batimento mecânico a temperatura de 30°C. Leva em consideração a estabilidade, o tempo de desenvolvimento e o enfraquecimento da massa. Quanto maior o índice, maior é a estabilidade durante a mistura.

Índice de Glúten: O índice de glúten indica a resistência do glúten ao aquecimento. Quanto maior o índice, maior é a resistência do glúten ao aquecimento.

Índice de Viscosidade: É o índice de avaliação da gelatinização do amido que depende das características do amido, valores baixos podem indicar a presença de amido danificado e/ou enzimas que agem hidrolisando o amido em temperatura menor que 90°C. Quanto maior o índice, maior é a viscosidade da massa durante o aquecimento.

Índice de Amilase: O índice da atividade enzimática representa a atividade da alfa amilase endógena ou adicionada, que depende da capacidade do amido em resistir ao ataque das amilases. Quanto maior o índice, menor é atividade amilásica.

Índice de retrogradação de água do amido: Tem relação com a firmeza dos produtos e características de hidrólise do amido e durante o ensaio. Quanto maior o índice, menor é o tempo de prateleira do produto final.

A análise no equipamento Mixolab, protocolo Chopin+ é formado por dois gráficos, Standard e Profiler. O gráfico Standard apresenta resultados numéricos a partir de torques na unidade de Newton Metro (Nm) representados pelas constantes C1, C2, C3, C4 e C5. O gráfico Profiler é um resumo do Standard é apresentado de forma qualitativa a partir de índices/notas de 0 a 9 para os parâmetros de absorção, mistura, glúten, viscosidade, amilase e retrogradação (GRANOTEC, 2017).

2.4.3. Reofermentografia

A Reofermentografia analisa o comportamento da massa e levedura durante o processo de fermentação sob condições controladas. Uma massa é preparada e

colocada no cesto de fermentação, sobre ela são colocados 4 discos de 500g cada em um pistão. O pistão está conectado a um sensor de deslocamento que calculará o desenvolvimento da massa. O cesto de fermentação está ligado a um circuito pneumático que permite mensurar a produção de gás durante a fermentação. O teste tem duração de 3 horas a uma temperatura de 28,5°C. Os valores são interpretados de acordo com as seguintes constantes: T1: Tempo máximo de elevação expresso em horas e minutos; Hm: altura máxima do desenvolvimento da massa, expresso em mm; T2 a T'2 : tempo da relativa estabilização do ponto máximo, sendo 12% do Hm, desde que a diferença não seja inferior a 6 mm; T2= T2 – T'2 : tolerância da massa; h: altura da massa no final do teste; $(Hm-h) / Hm$: percentual de queda do desenvolvimento da massa depois de 3 horas comparado com T1.

2.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO DA α -AMILASE PRODUZIDA EM FSM POR *ASPERGILLUS oryzae* LPB 5593 NO PROCESSO DE PANIFICAÇÃO.

As aplicações foram conduzidas em laboratório industrial de uma planta piloto da empresa Granotec do Brasil, Cidade Industrial de Curitiba, Estado do Paraná.

Os estudos de aplicação da formulação em pó da enzima α -amilase LPB produzida no laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia – UFPR, foram feitos em massas formuladas para a produção de pães. Foram feitas aplicações nas mesmas condições (formulação, tempo e temperatura) para a enzima comercial (α -amilase fungica Spring alpha 140.000) com o objetivo de comparar e verificar o potencial apresentado dos produtos enzimáticos obtidos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A amostra de enzima LPB foi submetida à determinação da sua atividade enzimática para definição da dosagem de aplicação em processo de produção de

pão. Da mesma forma buscou-se determinar a atividade enzimática da enzima amilase comercial utilizando-se o mesmo procedimento. Tal procedimento visou a equivalência das unidades, a determinação da dosagem de aplicação e a comparação dos resultados. A Tabela 5.2 mostra os valores das atividades enzimáticas determinadas para as enzimas teste, amostra α -amilase LPB e comercial Spring Alpha 140.000.

TABELA 5.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ENZIMA α -AMILASE LPB DILUÍDA 200X E ENZIMA COMERCIAL SPRING ALPHA 140.000 DILUÍDA 600X

α-amilase LPB diluição 200 vezes	Spring Alpha diluição 600 vezes
768 U.mL ⁻¹	1390 U.mL ⁻¹

Na Tabela 5.2 pode-se observar as atividades enzimáticas da enzima α -amilase LPB (diluída 200x) e comercial Spring Alpha 140.000 (diluída 600x). A enzima α -amilase LPB diluída 200x, apresentou atividade enzimática de 768 U.mL⁻¹, a, enzima comercial Spring Alpha 140.000 diluída 600x, apresentou atividade enzimática de 1390 U.mL⁻¹. A enzima α -amilase LPB apresenta, portanto, atividade inferior à atividade da enzima comercial Spring Alpha 140.000, indicando para aplicação industrial, a necessidade de uma dosagem superior à enzima comercial.

3.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS ENZIMAS POR APLICAÇÃO EM EQUIPAMENTOS

3.2.1. *Falling Number Fungal*

As amostras preparadas, conforme Tabela 5.1, foram submetidas à análise de *Falling Number Fungal*, a fim de avaliar se a atividade da enzima adicionada seria

detectada na farinha de trigo. Os resultados da análise de *Falling Number Fungal* podem ser visualizados na Tabela 5.3.

TABELA 5.3. RESULTADOS DE FALLING NUMBER FUNGAL PARA ENZIMA α -Amilase LPB E ENZIMA COMERCIAL SPRING ALPHA

Amostra	Falling Number Fungal (s)
Branco	287
α -amilase LPB 20ppm	187
Spring Alpha 20 ppm	>62
α -amilase LPB 30ppm	106
Spring Alpha 30 ppm	92

O *Falling Number* (FN) ou Número, ou Índice de Queda, é um método padronizado internacionalmente e o mais usado para determinar o dano por brotamento. Com o Falling Number, o dano causado por condições ambientais ou brotamento em trigo ou centeio podem ser detectado nos grãos armazenados em silo em questão de minutos. O Falling Number Fungal indica a medida da atividade da α -amilase fúngica presente na farinha de trigo. A mesma interpretação da análise de Falling Number padrão é utilizada para o método fungal (valores altos indicam baixa atividade da α -amilase, e valores baixos, indicam alta atividade). Todas as amostras tiveram resultados abaixo do valor do teste Branco (287 s), indicando a presença da α -amilase. A amostra Granotec (Spring Alpha 140000) 20ppm apresentou um índice de <62 s e a Enzima LPB na mesma concentração apresentou 187s, ou seja, baixa atividade. Já nos testes realizados em maiores dosagens da enzima LPB e Granotec, na concentração de 30 ppm, os índices foram de 106 e 92 s, respectivamente. Trigo com alto teor de alfa-amilase (falling number baixo) é indesejado em panificação pois o miolo tende a se apresentar escuro e pegajoso (MÓDENES et al., 2009). O valor elevado do Número de Queda (*Falling Number*) indica uma atividade fermentativa limitada, adequada para ser

suplementada por amilases (PASQUALONE et al., 2004; PASQUALONE et al., 2007). Três fatores principais estão relacionados com altos teores de alfa-amilase em farinhas de trigo: germinação antecipada do grão de trigo imaturo, síntese de alfa-amilase durante a maturação retardada do grão, e germinação do grão após superação da dormência devido à colheita atrasada (INDRANI; RAO, 2007; XU; BIETZ; CARRIERE, 2007).

3.2.2. Mixolab

Os resultados do gráfico Standard estão na Tabela 5.4 e o Profiler na Figura 5.1. A absorção de água, o tempo de desenvolvimento da massa, estabilidade e enfraquecimento são parâmetros que se referem às características da massa durante a mistura à temperatura constante, 30°C, que descrevem o comportamento da massa durante o processo de amassamento (BONET, BLAZCZAK, ROSELL, 2006).

TABELA 5.4 - RESULTADOS DOS TESTES STANDARD COM CARACTERÍSTICAS DA MASSA DO PÃO PARA APLICAÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE LPB E SPRING ALPHA 140.000

PARÂMETROS	Branco	α -amilase LPB 20ppm	Spring Alpha 20 ppm	α -amilase LPB 30ppm	Spring Alpha 30 ppm
Absorção (%)	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
Tempo de desenv. (min)	1,42	1,32	1,30	1,42	1,40
Estabilidade (min)	10,77	2,97	2,78	3,70	3,57
Cs	1,05	0,83	0,81	0,93	0,91
C1 Nm	1,15	1,05	1,03	1,129	1,143
C2 Nm	0,62	0,38	0,35	0,40	0,39
C3 Nm	1,95	1,68	1,55	1,62	1,60
C4 Nm	1,84	1,46	1,34	1,51	1,47
C5 Nm	2,57	1,95	1,78	2,03	1,98

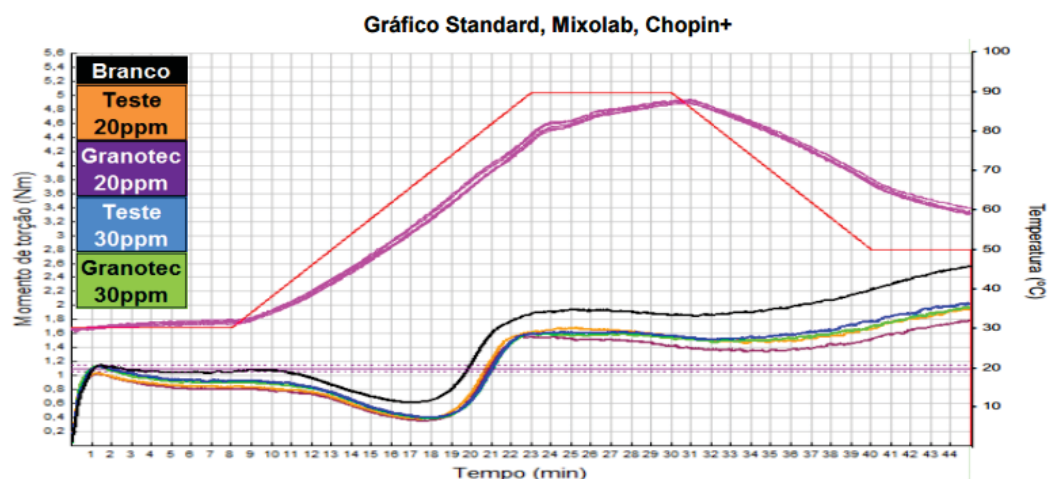


FIGURA 5.1 - GRÁFICO PROFILER – RESULTADOS QUALITATIVOS DO STANDARD PARA AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASES LPB E SPRING ALFA 140.000

No gráfico Standard a absorção é a quantidade necessária de água para que a massa atinja a linha $1,1\text{Nm} \pm 0,5$. Todos os testes foram analisados considerando 62,5% de absorção, ou seja a absorção da farinha de trigo utilizada sem a adição das enzimas (Branco). O tempo de desenvolvimento é o tempo que a amostra leva para atingir seu pico máximo. Os resultados não tiveram considerável alteração em relação ao branco, nem mesmo entre si. Observando o parâmetro de tempo de desenvolvimento, a farinha (Controle) apresentou tempo de desenvolvimento de 1,42 min, seguida da amostra α -amilase LPB com tempo de desenvolvimento de 1,42 minutos e enzima comercial Spring alfa 140.000 com 1,40 minutos para dosagens de 30 ppm. As aplicações com dosagens de 20 ppm mostraram tempo de desenvolvimento de 1,32 minutos e 1,30 minutos, respectivamente. Hadnadev, Torbica e Hadnadev (2011) encontraram tempo de desenvolvimento de farinha de trigo de 1,43 min. Banu et al. (2011) verificaram que farinha de trigo adicionada de α -amilase fúngica possui menor tempo de desenvolvimento quando comparada à farinha sem adição da enzima. A estabilidade é calculada pela fórmula C1-11% com temperatura constante de 30°C até o oitavo minuto. A estabilidade em todos os testes foi afetada com a adição das enzimas, sendo a estabilidade do branco 10,77 minutos e a estabilidade dos demais testes inferior a 4 min, indicando que a ausência da enzima α -amilase fúngica diminui a hidrólise das cadeias amilolíticas durante a mistura (HADNADEV, TORBICA e HADNADEV, 2011). Resultados de

estabilidade da massa com a presença de alfaamilase, xilanase e transglutaminase e com a presença somente de alfa-amilase na massa mostraram melhor índice de tolerância à mistura (NUNES, 2008). A amostra α -amilase LPB apresenta valor de torque em C2 de 0,40 (Nm) para aplicação com 30 ppm, valor maior que o registrado para aplicação com 20 ppm (0,38 ppm). A constante C2 está diretamente ligada à desnaturação da rede proteica do glúten causada pelo aquecimento, sendo que, quanto maior o valor do torque, mais fortes são os enlaces proteicos, indicando um glúten mais tenaz e resiltente ao desenvolvimento da fermentação e crescimento do pão, do contrário, mais extensível é o glúten (BANU et al., 2011).

A constante C3 está relacionada ao maior torque produzido durante a gelatinização do amido, indicando presença de amido danificado ou atuação de enzimas sobre o amido. Valores altos indicam menor ação de enzimas e/ou menor presença de amido danificado. A constante C4 está diretamente ligada à atividade enzimática da alfa amilase endógena da farinha ou adicionada, já que esta fase ocorre quando a temperatura estabiliza em 90°C. Valores altos indicam menor concentração de amilases, do contrário maior concentração. A retrogradação de água do amido é medida pela constante C5 onde valores menores apresentam menor retrogradação de água e valores maiores indicam maior retrogradação da água, levando a uma perda da maciez no shelf life.

Os resultados evidenciaram que todas as enzimas testadas tiveram efeitos anti-staling positivos no pão. A adição de α -amilase diminuiu significativamente o aumento da perda de água e da firmeza, confirmando os dados da literatura (BŁASZCZAK et al., 2004; BOLLAÍN, ANGIOLONI e COLLAR et al., 2005; JIMENEZ e MARTÍNEZANAYA, 2001).

A interpretação acima é considerada para uma farinha de trigo pura, sem a adição de aditivos ou ingredientes, no entanto tal interpretação auxilia no entendimento do comportamento de um determinado aditivo na farinha de trigo. Em todos os testes observa-se uma diminuição dos valores das constantes C2, C3, C4 e C5, no entanto sua maior ação está nas constantes C3, C4 e C5, pois as mesmas estão relacionadas à qualidade do amido, incidindo diretamente na qualidade e características do produto final.

TABELA 5.5. RESULTADO QUALITATIVO PARA OS PARÂMETROS DE ABSORÇÃO, MISTURA, GLÚTEN, VISCOSIDADE, AMILASE E RETROGRADAÇÃO

PARÂMETROS	Branco	α -amilase LPB 20ppm	Spring Alpha 20 ppm	α -amilase LPB 30ppm	Spring Alpha 30 ppm
Absorção	8	8	8	8	8
Mistura	3	1	1	1	1
Glúten	8	6	6	6	6
Viscosidade	7	5	4	4	4
Amilase	8	6	6	7	6
Retrogradação	6	3	3	4	4

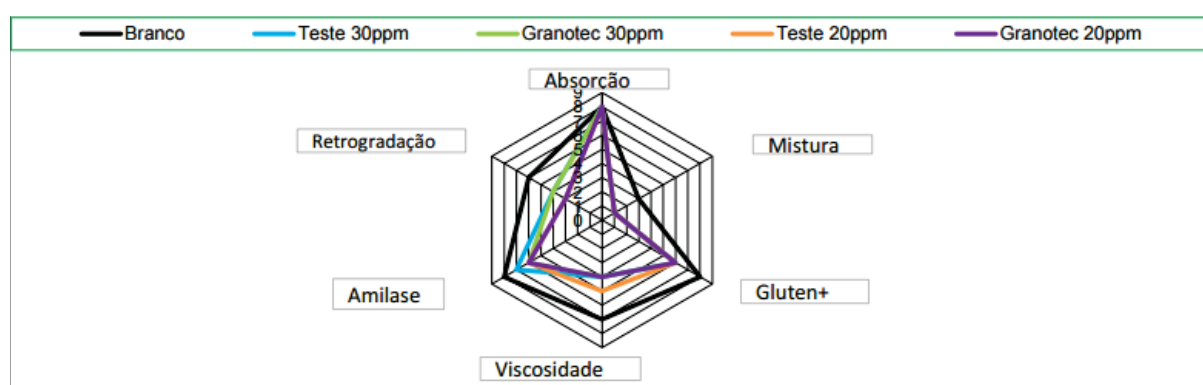


FIGURA 5.2. GRÁFICO PROFILER, MIXOLAB, CHOPIN+

Em todos os testes observa-se uma diminuição do índice dos parâmetros de mistura, glúten, viscosidade, amilase e retrogradação, no entanto os parâmetros de viscosidade, amilase e retrogradação são os relacionados à qualidade do amido e onde ocorre com maior intensidade a ação das enzimas amilolíticas. A atividade de amilase pode ser verificada em C4 (Nm) para todas as aplicações, que quando comparadas ao teste “Branco” com 1,84 Nm apresentam valores inferiores como por exemplo 1,51 Nm para amostra α -amilase LPB com dosagem de 30 ppm. Torbica e Hadnadev (2011) encontraram torque C4 de 2,01 Nm para amostra de farinha de trigo sem tratamento. Com o resfriamento da massa ocorre a retrogradação e a consistência é aumentada (COLLAR, BOLLAIN, ROSELL, 2007; BANU, et al., 2011). O torque final medido na análise Mixolab é determinado após o resfriamento da massa de 50°C. A amostra “Branco” apresentou o maior torque C5, sendo de 2,57 Nm, pois não contém adição de ingredientes ou enzimas amilolíticas que poderiam diminuir a consistência da massa. O maior torque C5 (Nm) entre as formulações foi da aplicação com 30 ppm da enzima α -amilase LPB de 2,03 Nm, indicando que a

ausência da α -amilase fúngica interfere na hidrólise entre as enzimas, não ocorrendo a diminuição da retrogradação. O menor torque C5 (Nm) obtido foi da formulação com Spring Alpha 140.000 de 1,78 Nm para aplicação de 20 ppm, indicando maior hidrolisação das cadeias amilolíticas e diminuição da consistência da massa, resultando na aptidão da conservação da característica de frescor do pão ao longo da vida útil. Estudos feitos por Banu et al. (2011) mostram que amostras que continham α -amilase fúngica na composição obtiveram valores menores do torque (2,78 Nm) comparado ao torque da amostra controle (2,93 Nm), valores superiores comparados ao do presente estudo. Redução na vida útil dos pães foi observada por Rojas, Rossel e Benedito (1999) após verificarem a diminuição do torque final C5 (Nm) de farinhas com enzimas α -amilase. Giménez et al. (2007) e Courtine Delcour (2002) demonstraram que as amilases melhoram a qualidade do pão e a vida de prateleirado produto; uma possível explicação está na diminuição da umidade do produto final.

3.2.3. Reofermentografia

Os resultados obtidos nos ensaios de reofermentografia encontram-se a seguir. As curvas de desenvolvimento da massa bem como as de retenção gasosa obtidas das misturas estão apresentadas Tabelas 5.6 e 5.7.

TABELA 5.6. RESULTADOS DE ANÁLISE DE REOFERMENTOGRAFIA

Amostra	Hm (mm)	H (mm)	(Hm-h)/Hm (%)	T1
Branco	49,6	49,6	0,0	03:00:00
α -amilase LPB 20ppm	68,4	68,2	0,3	02:57:00
Spring Alpha 20 ppm	74,3	74,3	0,0	3:00:00
α -amilase LPB 30ppm	76,5	76,1	0,5	02:52:30
Spring Alpha 30 ppm	68,7	66,4	3,4	02:46:30

Nos testes ocorreu um aumento da altura máxima da massa (Hm) com a aplicação da α -amilase LPB 30 ppm (76,5 mm) e altura final do teste (h) (76,1 mm)

em relação ao Branco ($H_m = 49,6$ mm e $h = 49,6$ mm), devido à ação das enzimas adicionadas (Enzima α -amilase LPB e Enzima Spring Alpha 140.000), pois as mesmas têm impacto direto no aumento do volume da massa, bem como no volume do produto final. O segundo melhor resultado foi para aplicação da enzima Granotec Spring Alpha 140.000 20 ppm ($H_m = 74,3$ mm e $h = 74,3$ mm). Todas as aplicações mostraram ação positiva das α -amilases em relação ao “branco”.

TABELA 5.7. RESULTADOS DE DESPRENDIMENTO GASOSO NA MASSA

Amostra	H'm (mm)	T1	Tx	Total Volume (mL)	Volume Perdido	Volume Retido	Coef. Retenção
Branco	58,1	02:57:00	01:24:00	1376	255	1121	81,5
α -amilase LPB 20ppm	52,2	02:57:00	01:27:00	1274	178	1096	86
Spring Alpha 20 ppm	51,7	02:33:00	01:28:00	1241	147	1093	88,1
α -amilase LPB 30ppm	58,0	01:22:30	01:22:30	1403	149	1254	89,4
Spring Alpha 30 ppm	56,0	01:13:30	01:34:30	1384	153	1231	88,9

H'm : altura máxima da curva de desprendimento gasoso, expresso em mm;

T'1: tempo gasto para alcançar H'm;

Tx: tempo de porosidade da massa (tempo em que a massa começa a liberar CO₂);

Volume total: volume total de CO₂ produzido;

Volume de CO₂ perdido: volume de CO₂ liberado durante o teste;

Coeficiente de retenção: volume retido / volume total x 100.

No gráfico de desenvolvimento gasoso (FIGURA 3 e 4), observa-se um aumento na retenção do gás nas massas (coeficiente de Retenção) para as aplicações de α -amilase em relação ao Branco. A aplicação da enzima α -amilase LPB (30 ppm) registrou maior aumento da retenção de gás 89,4% no tempo T'1 de 1,22 horas, necessário para alcançar a altura máxima de desprendimento gasoso H'm (58 mm) e com volume total de 1403 mL. A aplicação com enzima Spring Alpha 140.000 apresentou 88,9% no tempo T'1 de 1,13 horas, altura máxima de desprendimento gasoso H'm (56 mm) e volume total de 1384 mL. As aplicações mostraram resultados superiores quando comparadas ao teste Branco, o que certamente foi devido a influência das enzimas amilolíticas.

Branco

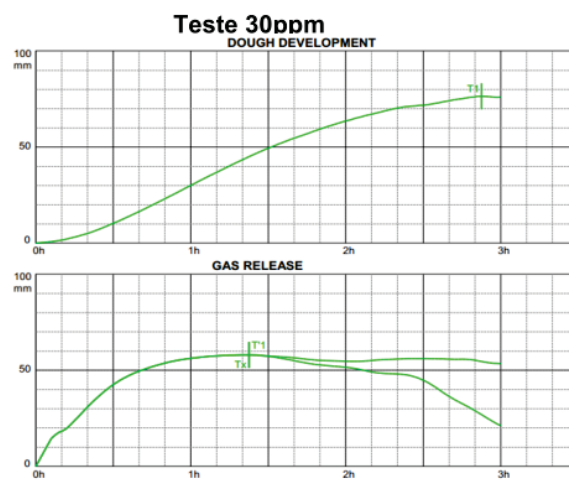
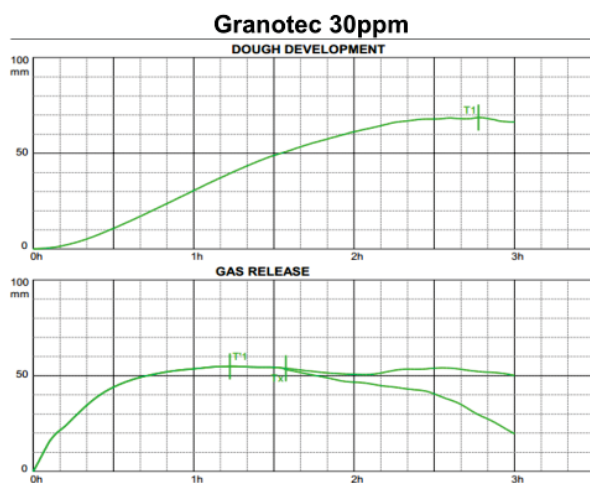
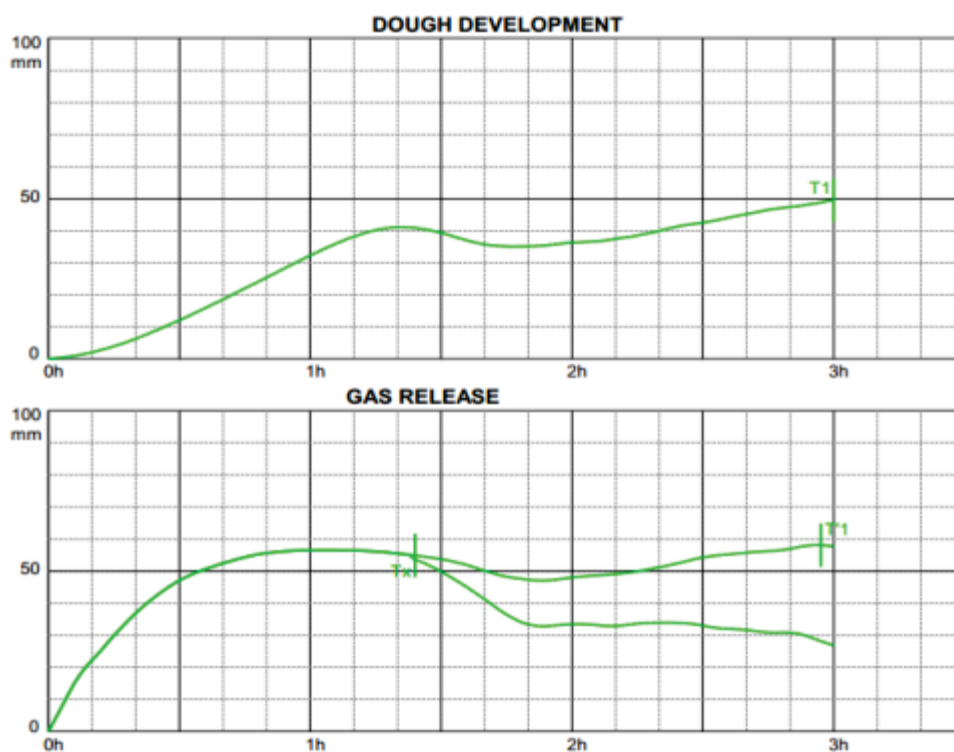
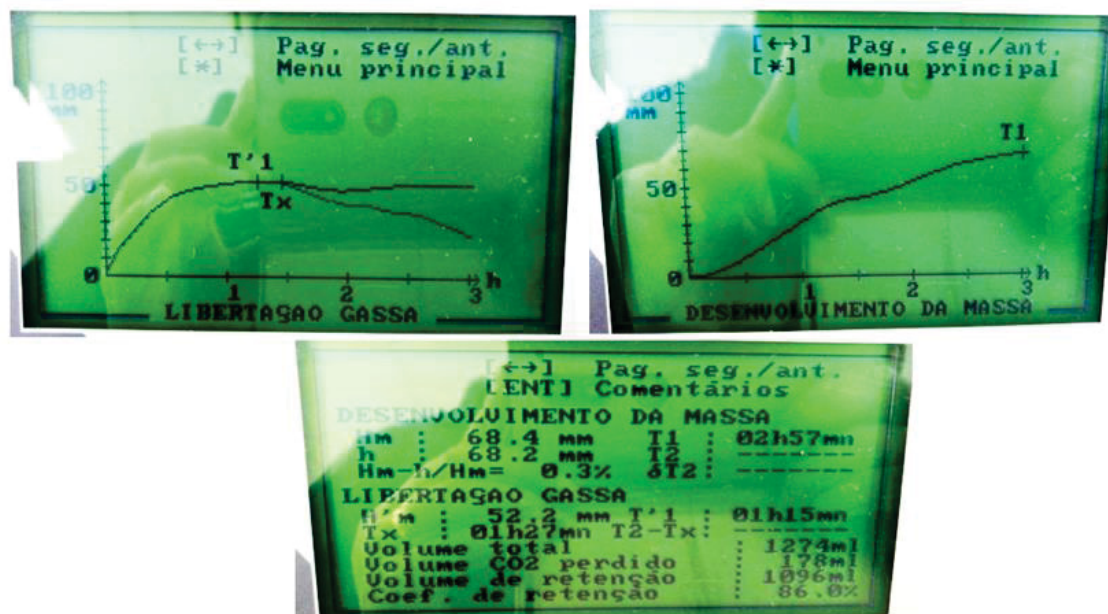


FIGURA 5.3. GRÁFICO DE DESENVOLVIMENTO GASOSO PARA APLICAÇÕES DE α -AMILASE PÓ (α -AMILASE LPB E SPRING ALPHA 140.000) COM 30ppm

Amostra α -amilase LPB



Amostra Spring Alpha 140000

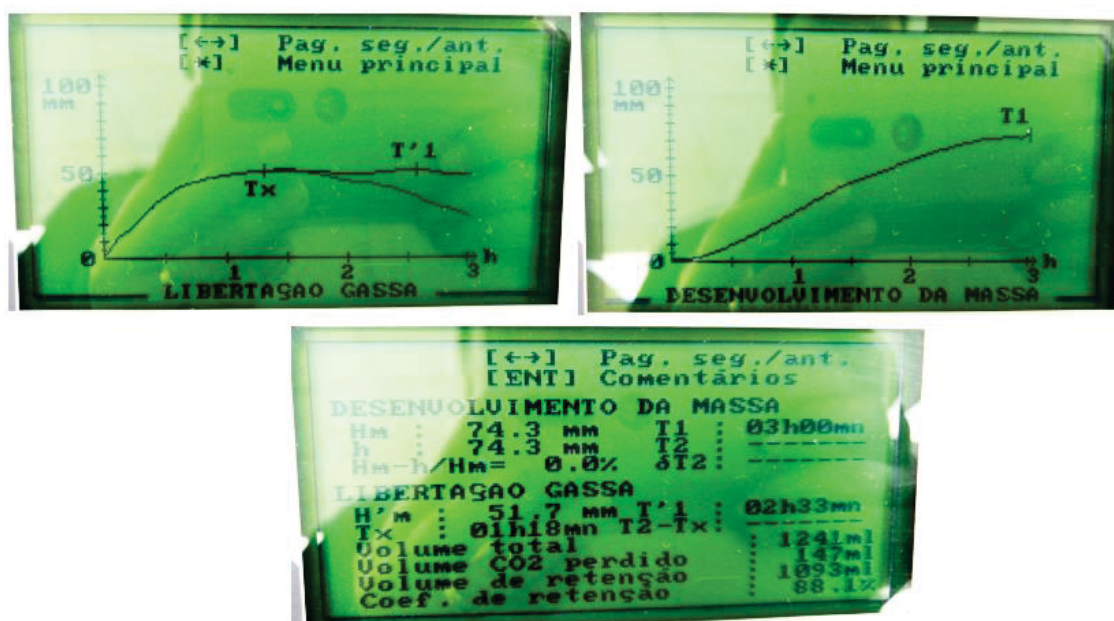


FIGURA 5.4. GRÁFICO DE DESENVOLVIMENTO GASOSO PARA APLICAÇÕES DE α -AMILASE PÓ (α -AMILASE LPB E SPRING ALPHA 140.000) COM 20ppm.

As avaliações mostram semelhantes resultados de aplicações da enzima α -amilase LPB em relação à enzima comercial.

A aplicação da alfa-amilase na panificação está ligada a capacidade de diminuição do amido danificado, o qual aumenta a absorção de água pela farinha de trigo, prejudicando a qualidade do produto final, bem como o volume da massa e a textura do miolo (MÓDENES; SILVA; TRIGUEROS, 2009). Estudos recentes reportam que a incorporação de amilase e xilanase na produção de pães melhora a suavidade e flexibilidade de pães (HEMALATHA, LEELAVATHI, PRASADA RAO e SALIMATH, 2010)

3.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE APLICAÇÃO DA α -AMILASE PRODUZIDA EM FSM POR *ASPERGILLUS ORYZAE* LPB 5593 NO PROCESSO DE PANIFICAÇÃO

3.3.1 Aplicação da enzima α -amilase LPB líquida

Os testes foram realizados utilizando-se formulação descrita no item (2.5) deste capítulo. A Tabela 5.8 apresenta os resultados da aplicação da enzima comercial (α -amilase fungica Spring alpha 140.000) dosagem 20 ppm e da enzima líquida amostra α -amilase LPB em duas dosagens, 40 ppm e 80 ppm, uma vez que a enzima α -amilase LPB foi formulada, mas não concentrada, por isso possui menor atividade do que a atividade da enzima comercial.

Na comparação geral entre as enzimas α -amilase LPB líquida e a enzima comercial Spring Alpha 140.000, a enzima α -amilase LPB apresentou volume de 7,3 cm³ para dosagens de 40 ppm e 7,1 cm³ para dosagens de 80 ppm, valores inferiores ao volume apresentado pela enzima comercial Spring alpha 140.000 com volume de 8 cm³ (Tabela 5.8), o que representa atuação mais lenta e menor produção de gás durante a fermentação. Os demais parâmetros como coloração da casca, crocância, com pestana aberta, estrutura simétrica e aspecto geral foram semelhantes e podem ser observados na Tabela 5.8.

TABELA 5.8. RESULTADOS DE APLICAÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE LPB LÍQUIDA (40 E 80 ppm) E ENZIMA COMERCIAL SPRING ALPHA 140.000 (20 ppm)

TESTES	1	2	3
RECEITA	%	%	%
Farinha de trigo	100	100	100
Sal	2	2	2
Fermento	1	1	1
Água	58	58	58
INGREDIENTES	1	2	3
Ácido Ascórbico	0,01	0,01	0,01
ADA 100	0,004	0,004	0,004
Spring Alpha 140.000	0,002	0	0
Spring 2020	0,004	0,004	0,004
Spring F2	0,001	0,001	0,001
Spring GLUZ	0,0005	0,0005	0,0005
SSL	01	01	01
Alfa Amilase LPB	0	0,004	0,008
PROCESSO	1	2	3
Tempo de batimento lenta (min)	3	3	3
Tempo de batimento rápida (min)	7	7	7
Tempo de fermentação (H)	5	5	5
Temperatura de forno (°C)	180	180	180
Tempo de assamento (min)	16	16	16
ASPECTO DA MASSA	1	2	3
Aspecto da massa (dura, normal, mole, pegajosa)	Normal	Normal	Normal
Crescimento no final da fermentação (pouco, normal, muito)	Normal	Normal	Normal
Resistência ao corte (sim, não)	Sim	Sim	Sim
Salto de forno (ruim, bom, ótimo)	Bom	Bom	Bom
ASPECTO DO PÃO	1	2	3
Cor da casca (pálida, normal, escura)	Normal	Normal	Normal
Crocância (não, sim)	Sim	Sim	Sim
Pestana (fechada, parcialmente aberta, aberta, totalmente aberta)	Aberta	Aberta	P. Aberta
Estrutura do pão (lastrado, simétrico)	Simétrico	Simétrico	Simétrico
Aspecto geral (ruim, bom, ótimo, excelente)	Bom	Bom	Bom
Volume (cm ³)	8	7,3	7,1

A Figura 5.5 mostra que o produto obtido com α -amilase LPB (amostras 2 e 3) teve boa apresentação porém com menor volume e com pestana levemente mais fechada. Os resultados mostram que o aumento da dosagem de aplicação da enzima α -amilase LPB para 80 ppm não melhorou as características de volume, sendo ainda inferior à aplicação com 40 ppm.



FIGURA 5.5. PRODUTOS DE APLICAÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASES. AMOSTRA (1) SPRING ALPHA 140.000 (20 ppm) E AMOSTRAS (2) 40 ppm E (3) 80 ppm DA α -AMILASE LPB LÍQUIDA

3.3.2 Aplicação da enzima α -amilase LPB em pó

As aplicações das enzimas α -amilase LPB e comercial Spring Alpha 140.000 em pó foram feitas nas concentrações 20ppm e 30ppm e os resultados foram satisfatórios (TABELA 5.9). Os parâmetros de processo mantiveram-se inalterados. A atuação da enzima α -amilase LPB mostrou-se eficiente com volume de produto final de 9,2 cm³ para aplicação de 20 ppm (amostra 2) e 9 cm³ para aplicação de 30 ppm (amostra 3). O volume é um fator preponderante na avaliação do produto final. O volume apresentado pela enzima comercial Spring Alpha 140.000 foi de 9,1 cm³ (amostra 1), e se comparado aos volumes obtidos nas aplicações mostra que a enzima teste α -amilase LPB atuou no processo de hidrólise do amido da farinha, produzindo estruturas menores sendo mais facilmente absorvidas durante a fermentação e auxiliando na retenção de gases e formação do volume. As características do produto final podem ser observadas na Figura 5.6.

TABELA 5.9. RESULTADOS DE APLICAÇÃO DAS ENZIMAS α -AMILASE LPB PÓ (20 E 30 ppm) E ENZIMA COMERCIAL SPRING ALPHA 140.000 (20 ppm)

TESTES	1	2	3
RECEITA	%	%	%
Farinha de trigo	100	100	100
Sal	2	2	2
Fermento	1	1	1
Água	57	57	57
INGREDIENTES	1	2	3
Ácido Ascórbico	0,01	0,01	0,01
ADA 100	0,004	0,004	0,004
Spring Alpha 140.000	0,002	0	0
Spring 2020	0,004	0,004	0,004
Spring F2	0,001	0,001	0,001
Spring GLUZ	0,0005	0,0005	0,0005
SSL	01	01	01
Alfa Amilase LPB (pó)	0	0,002	0,003
PROCESSO	1	2	3
Tempo de batimento lenta (min)	3	3	3
Tempo de batimento rápida (min)	7	7	7
Tempo de fermentação (H)	4	4	4
Temperatura de forno (°C)	180	180	180
Tempo de assamento (min)	15	15	15
ASPECTO DA MASSA	1	2	3
Aspecto da massa (dura, normal, mole, pegajosa)	Normal	Normal	Normal
Crescimento no final da fermentação (pouco, normal, muito)	Normal	Normal	Normal
Resistência ao corte (sim, não)	Sim	Sim	Sim
Salto de forno (ruim, bom, ótimo)	Ótimo	Ótimo	Ótimo
ASPECTO DO PÃO	1	2	3
Cor da casca (pálida, normal, escura)	Normal	Normal	Normal
Crocância (não, sim)	Sim	Sim	Sim
Pestana (fechada, parcialmente aberta, aberta, totalmente aberta)	Aberta	Aberta	Aberta
Estrutura do pão (lastrado, simétrico)	Simétrico	Simétrico	Simétrico
Aspecto geral (ruim, bom, ótimo, excelente)	Ótimo	Ótimo	Ótimo
Volume (cm ³)	9,1	9,2	9



FIGURA 5.6. PRODUTOS DE APLICAÇÃO DAS ENZIMAS (AMOSTRA 2 E 4) α -AMILASE LPB PÓ 20 E 30 ppm E ENZIMA COMERCIAL (AMOSTRA 1 E 3) SPRING ALPHA 140.000 (20 E 30 ppm)

As condições de processo de produção do pão tais como tempo de batimento lento, tempo de batimento rápido, tempo de fermentação, temperatura de forno e tempo de assamento foram mantidas iguais em todas as avaliações.

4 CONCLUSÕES

A amilase LPB produzida por FSm com *Aspergillus oryzae* LPB 5593 apresentou desempenho satisfatório para aplicação em panificação, principalmente na versão em pó. A formulação líquida apresentou efeito inferior ao obtido com a aplicação da enzima comercial. As respostas obtidas para o aspecto da massa, crescimento, fermentação, resistência, salto de forno e volume foram semelhantes às obtidas para com a aplicação da enzima comercial. A enzima líquida apresentou resultados próximos aos obtidos com a aplicação da enzima comercial, devido principalmente ao fato de a enzima líquida LPB não ter passado por processo de concentração e apresentar, portanto, menor atividade.

O estudo da aplicação da enzima produzida amostra α -amilase LPB em panificação permitiu reconhecer o seu ótimo desempenho, possibilitando a validação da qualidade do produto obtido com grandes perspectivas de produção em escala industrial.

5 REFERÊNCIAS

BANU, J.; STOENESCU, G.; IONESCU, V.; APRODU, J. Estimation of the Baking Quality of Wheat Flour Based on Rheological Parameters of the Mixolab Curve. **Czech Journal of Food Sciences**, v.29, p. 35-44, 2011.

BOUSSINGAULT, J. B. 1852. De la transformation du pain tender en pain rassis. **Ann. Chem. Phys.** 3 Ser. 36, p. 490. (Original not seen. Cited in Wilhoft 1973.)

BANU, J.; VASILEAN, I.; APRODU, J. Evaluation of rheological behaviour of whole rye and buckwheat blends with whole-wheat flour using Mixolab. **Italian Journal of Food Science**, v.22, p. 83-89, 2010.

BONET, A. BLASZCZAK W., ROSELL, C.M. Formation of homopolymers and heteropolymers between wheat flour and several protein sources by transglutaminasecatalyzed cross-linking. **Cereal Chemistry**, v. 83, p. 655-662, 2006.

BECHTEL, W. G., MEISNER, D. F., & BRADLEY, W. B. (1953). The effect of the crust on the staling of bread. **Cereal Chemistry**, 30, 160.

COLLAR, C.; BOLLAIN, C.; ROSELL, C. M. Rheological behavior of formulated bread doughs during mixing and heating. **Food Science Technology International**, v. 13, p. 99-107, 2007.

DAMAGER I, ENGELSEN SB, BLENNOW A, MØLLER BL, MOTAWIA MS. 2010. First principles insight into the alpha-glucan structures of starch: their synthesis, conformation, and hydration. **Chemical Reviews** 110, 2049–2080. [PMC free article] [PubMed]

DARYL MARES, KOLUMBINA MRVA. Late-maturity α -amylase: Low falling number in wheatin the absence of preharvest sprouting. **Journal of Cereal Science** 47 (2008) 6–17.

HAMER RJ. Enzymes in the baking industry. In: Tucker GA, Woods LFJ, editors. Enzymes in food processing. **Galsgow: Blackie Academic and Professional**, 1995:190-222.

HADNADEV, T. D.; TORBICA, A.; HADNADEV, M. Rheological properties of wheat flour substitutes / alternative crops assessed by Mixolab®. **Procedia Food Science**, v.1, p. 328-334, 2011.

HEMALATHA, M. S., LEELAVATHI, K., PRASADA RAO, U. J. S., & SALIMATH,P. V. (2010). Influence of amylases and xylanases on chemical,sensory, amylograph properties and microstructure ofchapati. **LWT-Food Science and Technology**, 43, 1394–1402.

INDRANI, D.; RAO, G. V. Rheological characteristics of wheat flour dough as influenced by ingredients of Parotta, v. 17, n. 1, p. 110-105, 2007.

J.A. GRAY, J.N. BEMILLER. Bread Staling: Molecular Basis and Control. **Food Science and Food Safety** · January 2003.

KHAKIMOV, B, JESPERSEN, BPM & ENGELSEN, SB 2014, 'Comprehensive and comparative metabolomic profiling of wheat, barley, oat and rye using gas chromatography-mass spectrometry and advanced chemometrics'. **Foods**, vol 3, no. 4, pp. 569-585. DOI: 10.3390/foods3040569.

KATZ, J.R. (1928). Gelatinization and retrogradation of starch in relation to the problem of bread staling. In: **A comprehensive survey of starch chemistry**. Ed. R.P. Walton, pp 100-117. New York, USA: The Chemical Catalog Company.

MÓDENES, A. N.; SILVA, A. M.; TRIGUEROS, D. E. G. Avaliação das propriedades reológicas do trigo armazenado. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 29, n.3, p.508-512, 2009.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, p. 426-428, 1957.

PETER R SHEWRY, NIGEL G HALFORD, PETER S BELTON, AND ARTHUR S TATHAM. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 2002 Feb 28; 357(1418): 133–142.

PURHAGEN, J.K., SJOO, M.F., ELIASSON, A.C., 2011. The use of normal and heat-treated barley flour and waxy barley starch as anti-staling agents in laboratory and industrial baking processes. **Jornal Food Eng**. 104,. 414-421.

VITOLO, M. 2001. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Coords.). Biotecnologia na produção de alimentos. **São Paulo: Edgard Blücher Ltda.**, 2001. p. 387-420.

VAN DAM, H. W.; HILLE, J. D. R. Yeast and enzymes in breadmaking. **Cereal Foods World, Saint Paul**, v. 37, n. 3, p. 245-252, mar. 1992.

XU, J.; BIETZ, J. A.; CARRIERE, C. V. Viscoelastic properties of wheat gliadin and gluten suspension. **Food Chem., Reading**, v. 101, n. 3, p. 1025-1030, 2007.

REFERÊNCIAS GERAIS

- A. RIAZ, S.A.U. QADER, A. ANWAR, S. IQBAL, **Aust. J. Basic Appl. Sci.** 3 (2009)
- A.KARIM, S.A.U. QADER, A. NAWAZ, A. AMAN. Immobilization of Endo (1→4) β-D-Glucanase from *Bacillus Licheniformis* KIBGE-IB2 Using Agar-Agar as Support for Continuous Use. **Chem. Eng. Trans.** 38 (2014) 409–414.
- A.M. OMEMU, I. AKPAN, M.O. BANKOLE, O.D. TENIOLA, Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM 07 isolated from soil. **African Journal of Biotechnology**. 4 (2005) 19-25.
- A.TRAMICE, E. PAGNOTTA, I. ROMANO, A. GAMBACORTA, A. TRINCONE. Transglycosylation reactions using glycosyl hydrolases from *Thermotoga neapolitana*, a marine hydrogen-producing bacterium. Vol. 47 (2007), p.21-27.
- ADRIE J J STRAATHOF. The Proportion of Downstream Costs in Fermentative Production Processes. **Comprehensive Biotechnology**, Second Edition, Chapter: 2.57, Publisher: Elsevier, Editors: Murray Moo-Young, pp.811-814
- AFTAB AHAMED, PATRICK VERMETTE. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. Volume 49, Issue 3, 15 May 2010, Pages 379–387.
- AHLAWAT, S.; DHIMAN, S.S.; BATTAN, B.; MANDHAN, R.P.; SHARMA, J. (2009). Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. **Process Biochemistry** 44, 521-526.
- AHMAD BAGHERI, REZA KHODARAHMI, ALI MOSTAFAIE. Purification and biochemical characterisation of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*: Relation to starch processing. **Food Chemistry** 161 (2014) 270–278
- AHMAD HOMAEI, DARIUSH SABERI. Immobilization of α-amylase on gold nanorods: An ideal system for starch processing. **Process Biochemistry**. Volume 50, Issue 9, September 2015, Pages 1394–1399
- AIYER, P.V., 2005. Amylases and their applications. **African Journal of Biotechnology** 4, 1525–1529.
- AMINI, K., SOROURADDIN, M.H., RASHIDI, M.R., 2011. Activity and stability of rat liver xanthine oxidase in the presence of pyridine. **Can. J. Chem.** 89, 1–7.
- ANSEL; POPOVICH; ALEN, 2007 WANG, D.; LU, M.; WANG, X.; JIAO, Y.; FANG, Y.; LIU, Z.; WANG, S. Improving stability of a novel dextran-degrading enzyme from

marine *Arthrobacter oxydans* KQ11. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 294-299, 2014.

ANURADHA GHOSH, BANHISIKHA CHATTERJEE, ARATI DAS. Purification and characterization of glucoamylase of *Aspergillus terreus* NA-170. **Mutant**. Vol.71, (1991), p.162–169

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Disponível em: www.portal.anvisa.gov**. Acesso em 24/07/2015.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO CNS/MS N.º 04, DE 24 DE NOVEMBRO DE 1988. **Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2d98d4804745761d8413d43fbc4c6735/Resolucao_04_1988.pdf?MOD=AJPERES>**. Acesso em: 08/01/2016.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Séries temáticas – Guia de estabilidade de produtos cosméticos, 2004. **Disponível em:<www.portal.anvisa.gov>**. Acesso em: 03/12/2015.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE nº 560, de 2 de abril de 2002. **Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>**. Acesso em abril/2016.

ARCHANA SHARMA, T. SATYANARAYANA., 2013. Structural and biochemical features of acidic α -amylase of *Bacillus acidicola*. **International Journal of Biological Macromolecules** 61 (2013) 416– 423.

ARCHANA SHARMA, T. SATYANARAYANA., 2013. Structural and biochemical features of acidic α -amylase of *Bacillus acidicola*. **International Journal of Biological Macromolecules** 61 (2013) 416– 423.

ARPANA KUMARI, ARVIND M. KAYASTHA. Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto Chitosan and AmberliteMB-150 beads: Optimization and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 69 (2011) 8–14

ARTI GUPTA, NEELAM GAUTAM AND DINESH RAJ MODI. Optimization of α -amylase production from free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. **E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research** Vol. 1(1). pp. 001-008 (2010).

ASHOK PANDEY, GEORGE SZAKACS, CARLOS R. SOCCOL, JOSE A. RODRIGUEZ-LEON, VANETE T. SOCCOL. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**. Vol. 77, (2001), Pages 203–214.

ASLAN, Y.; TANRISEVEN, A. Immobilization of *Penicillium lilacinum* dextranase to produce isomaltooligosaccharides from dextran. **Biochemical Engineering Journal** 34: 8–12, 2007.

ASTHER, M.; MEUNIER, J.C. Increased thermal stability of *Bacillus licheniformis* α -amylase in the presence of various additives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 902-905, 1990.

AULTON ME 2002. *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*. 2 ed. **Edinburg: Churchill Livingstone**, p. 388-390.

B.K. LONSANE.M.V. RAMESH. Production of Bacterial Thermostable α -Amylase by Solid-State Fermentation: A Potential Tool for Achieving Economy in Enzyme Production and Starch Hydrolysis. **Advances in Applied Microbiology**. Volume 35, 1990, Pages 1-56.

BAKER, R. W. *Membrane Technology and Applications*. 2. ed. **Chichester: John Wiley & Sons Ltd.**, 2004.

BANU, J.; STOENESCU, G.; IONESCU, V.; APRODU, J. Estimation of the Baking Quality of Wheat Flour Based on Rheological Parameters of the Mixolab Curve. **Czech Journal of Food Sciences**, v.29, p. 35-44, 2011.

BANU, J.; VASILEAN, I.; APRODU, J. Evaluation of rheological behaviour of whole rye and buckwheat blends with whole-wheat flour using Mixolab. **Italian Journal of Food Science**, v.22, p. 83-89, 2010.

BARBOSA, A. S. et al. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 5, n. 1, p. 63-79, jan./mar. 2010.

BECHTEL, W. G., MEISNER, D. F., & BRADLEY, W. B. (1953). The effect of the crust on the staling of bread. **Cereal Chemistry**, 30, 160.

BECKS S, BIELAWASKI C, HENTON D, PADALA R, BURROWS K, SLABY R. Application of a liquid stable amylase reagent on the Ciba Corning Express clinical chemistry system. **Clin Chem** 1995;41:S186.

BINOD, PARAMESWARAN; PALKHIWALA, PIYUSH; GAIKAIWARI, RAGHAVENDRA; NAMPOOTHIRI, K MADHAVAN; DUGGAL, ARVIND; DEY, KAKALI; PANDEY, ASHOK. (2013). *Present status and future perspectives for India*. **JSIR** Vol.72(05) P.271-286.

BOHDZIEWICZ, J., 1996. Ultrafiltration of technical amylolytic enzymes. **Process Biochemistry**, 31, 185-191.

BONET, A. BLASZCZAK W., ROSELL, C.M. Formation of homopolymers and heteropolymers between wheat flour and several protein sources by transglutaminase catalyzed cross-linking. **Cereal Chemistry**, v. 83, p. 655-662, 2006.

BOTELHO, P. S., MACIEL, M. I., BUENO, L. A., MARQUES MDE, F., MARQUES, D. N., AND SARMENTO SILVA, T. M. (2014). Characterization of a new

exopolysaccharide obtained from of fermented kefir grains in soy milk. **Carbohydr.Polym.**107,1–6. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.02.036

BOURNEOW C, BENJAKUL S, H-KITTIKUN A (2012) Hydroxamate-based colorimetric method for direct screening of transglutaminaseproducing bacteria. **World J Microb Biot** 28:2273–2277.

BOURNEOW, C.; BENJAKUL, S.; H-KITTIKUN, A. Impact of some additives on the stability of microbial transglutaminase from *Providencia* sp. C1112. **As. J. Food Ag-Ind.** n.5, v.03, p. 226-233, 2012.

BOUSSINGAULT, J. B. 1852. De la transformation du pain tender en pain rassis. **Ann. Chem. Phys.** 3 Ser. 36, p. 490. (Original not seen. Cited in Wilhoft 1973.)
BUCHHOLZ, K., & SEIBEL, J. (2008). Industrial carbohydrate biotransformation. **Carbohydrate Research**, 343, 1966–1979.

C. MATEO, J.M. PALOMO, G. FERNANDEZ-LORENTE, J.M. GUIBAN, R. FERNANDEZ-LAFUENTE, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity techniques, **Enzyme Microb.Technol.** 40 (2007) 1451–1463.

CANTAREL, B .I., COUTINHO, P. M., RANCUREL, T., LOMBARD, V., HENRISSAT, B. 2009.The Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy):na expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Res.** 37, D233-D238.

CARNEIRO RP. M.Sc. Dissertation. Belo Horizonte, Brasil: Faculdade de Farmácia. UFMG; 2010.

CASSANO, A.; DRIOLI, E.; GALALAVARNA, G.; MARCHELLI, R.; DI SILVESTRO, R.; CAGNASSO, P. (2003), Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes. **Journal of Food Engineering**, **57**, 153-163.

CHEMICAL WEEKLY, 11 Feb 2014, 167 (Website: <http://www.chemicalweekly.com>)
© **Sevak Publications & Chemical Weekly Database P Ltd** 2014

CHERYAN, M. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. Pennsylvania: **Technomic Publishing Company Inc.**, 1998.

CHI, Z.; CHI, Z.; LIU, G.; WANG, F.; JU, L.; ZHANG, T. (2009). *Saccharomycopsis fibuligera* and its applications in biotechnology. **Biotechnol Adv** 27, 423-431.

COLLAR, C.; BOLLAIN, C.; ROSELL, C. M. Rheological behavior of formulated bread doughs during mixing and heating. **Food Science Technology International**, v. 13, p. 99-107, 2007.

COSTA, S. A.; TZANOV, T.; CARNEIRO, A. F.; PAAR, A.; GÜBITZ, G. M., CAVACO-PAULO, A. Studies of stabilization of native catalase using additives. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 30, p. 387–391, 2002.

COSTANTINO VETRIANI, DENNIS L. MAEDER, NICOLA TOLLIDAY, KITTY S.-P. YIP, TIMOTHY J. STILLMAN, K. LINDA BRITTON, DAVID W. RICE, HORST H. KLUMP, FRANK T. ROBB. Protein thermostability above 100°C: A key role for ionic interactions. (1998). vol. 95 no. 21.

CRISTINA ANAMARIA SEMENIUC, ANCUȚA ROTAR, LAURA STAN, CARMEN RODICA POP, SONIA SOCACI, VIOARA MIREȘAN & SEVASTIȚA MUSTE. Characterization of pine bud syrup and its effect on physicochemical and sensory properties of kefir. *CyTA - Journal of Food*. Pages 213-218. (2015).

D.S. RIBEIRO, S.M.B. HENRIQUE, L.S. OLIVEIRA, G.A. MACEDO, L.F. FLEURI. **Enzymes in juice processing: a review**. Vol. 45, (2010) Pages 635–641

DABA, T., KOJIMA, K., INOUE, K. 2013. Chemical modification of wheat β -amylase by trinitobenzenesulfonic acid, methoxypolyethylene glycol, and glutaraldehyde to improve its thermal stability and activity. **Enzyme and Microbial Technology**. 53(6-7): 420-426.

DAKO, E., BERNIER, A.M., DADIE. A.T., JANKOWSKI, K., 2012. The problems associated with enzymes purification. In: Ekinici, D. (Ed.), **Chemical Biology** 444p.

DAMAGER I, ENGELSEN SB, BLENNOW A, MØLLER BL, MOTAWIA MS. 2010. First principles insight into the alpha-glucan structures of starch: their synthesis, conformation, and hydration. **Chemical Reviews** 110, 2049–2080. [PMC free article] [PubMed]

DARYL MARES, KOLUMBINA MRVA. Late-maturity α -amylase: Low falling number in wheat in the absence of preharvest sprouting. **Journal of Cereal Science** 47 (2008) 6–17.

DE SALES, P. M., DE SOUZA, P. M., SIMEONI, L. A., MAGALHAES, P. O., & SILVEIRA, D. (2012). α -Amylase inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 15, 141–183.

DECLERCK, N., MACHIUS, M., WIEGAND, G., HUBER, R. & GAILLARDIN, C. (2000). **J. Mol. Biol.** **301**, 1041–1057.

DENIZ SENYAY-ONCEL, H. ERTAS, Ozlem Yesil-Celiktas. Effects of supercritical fluid extraction parameters on unsaturated fatty acid yields of Pistacia terebinthus berries. **Journal of the American Oil Chemists Society**. 2011, Vol. 88, p.1061-1069

DENIZ SENYAY-ONCEL, OZLEM YESIL-CELIK TAS. Treatment of immobilized α -amylase under supercritical CO₂ conditions: Can activity be enhanced after consecutive enzymatic reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. Vol 91, (2013), p.72–76.

DESPOND, S., ESPUCHE, N., CARTIER, N., AND DOMARD, A. (2005). "Barrier properties of paper-chitosan and paper-chitosan-carnauba wax films," **J. Appl. Polym. Sci.** 98(2), 704-710.

DINIZ RO, GARLA LK, SCHNEEDORF JM, CARVALHO JC. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. **Pharmacol Res.** 2003 Jan ; 47(1) :49-52.

E L V HARRIS AND S ANGEL . Protein purification methods: A practical approach. pp 317. IRL **Press at Oxford University Press, Oxford.** 1989.

E. CEPEDA, M. HERMOSA, A. BALLESTEROS, Optimization of maltodextrin hydrolysis by glucoamylase in a batch reactor, **Biotechnol. Bioeng.** 76 (2001) 70–76.

ELIANA DE OLIVEIRA SANTOS; MEIRE LELIS LEAL MARTINS. Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp. **Braz. arch. biol. technol.** vol.46 no.1 Curitiba Jan. 2003

EL-SHERBINY, M. A.; EL-CHAGHABY, G. A. Storage temperature and stabilizers in relation to the activity of commercial liquid feed enzymes: a case study from Egypt. **Journal of Agrobiology**, v. 28, n. 2, p. 129–137, 2012.

ERIN E. PETERSEN AND ARGYRIOS MARGARITIS. (2001) Hydro dynamic and Mass Transfer Characteristics of Three-Phase Gaslift Bioreactor Systems. **Critical Reviews In Biotechnology** Vol. 21.

FARNWORTH ER, MAINVILLE I. Kefir - A Fermented Milk Product. In: Farnworth ER, editor. Handbook of Fermented Functional Foods. 2th ed. **CRC Press Taylor & Francis Group; Boca Raton, London, New York:** 2008. pp. 89–127. (2 ed) Farnworth ER. Kefir - a complex probiotic. **Food Sci Technol Bull: Functional Foods.** 2005;2:1–17.

FASANELLA, C. C. Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente. 2008. 80 f. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba.**

FATEMEHGASHTASBI,GHOLAMREZAAHMADIAN*,KAMBIZAKBARINOUGHABI. New insights into the effective nessof alpha-amylase enzyme presentation on the *Bacillus subtilis* spore Surface by adsorption and covalent immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**64–65(2014)17–23

FAZEKAS. E., SZABÓ, K., KANDRA, I., GYÉMÁNI, G. 2013. Unexpected mode of action of sweet potato β -amylase on maltooligomer substrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics.* 1834(10): 1976-1981.

FEITKENHAUER, H. (2003). Anaerobic digestion of desizing wastewater: influence of pretreatment and anionic surfactant on degradation and intermediate accumulation. **Enzyme Microb. Technol.** 33, 250-258.

FRANCO COLACINO & ROBERT R. CRICHTON (1997) Enzyme Thermostabilization: the State of the Art. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 14:1, 211-278.

G. DAVIES; B. HENRISSAT. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure** 15 September 1997, 3:853-859.

G. RAJAGOPALAN., C. KRISHNAN. α -Amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. (2008), P.3044-3050.

GARROTE GL, ABRAHAM AG, DE ANTONI G. Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. In: Mozzi F, Raya RR, Vignolo GM, editors. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria - Novel Applications**. Iowa: **Blackwell Publishing**; 2010. pp. 327–340.

GIRI NY, MOHAN AR, RAO LV, RAO CP. Immobilization of α -amylase complex in detection of higher oligosaccharides on paper. **Curr Sci** 1990;59:1339/40.

GOPAL K. CHOTANI, TIMOTHY C. DODGE, ALFRED L. GAERTNER AND MICHAEL V. ARBIGE. Industrial Biotechnology: **Discovery to Delivery**. 2007, XIV, 1875p. 100 illus., Hardcover.

GOYAL, N., GUPTA, J.K., SONI, S.K., 2005. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. **Enzyme Microb. Technol.** 37, 723–734.

GULLA, K. C.; GOUDA, M. D.; THAKUR, M. S.; KARANTH, N G. Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 19, p. 621–625, 2004.

GULLA, K.C., M.D. GUODA, M.S. THAKUR AND N.G. KARANTH, 2004. Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. **Biosensors Biotechnol.** 19: 621- 625. DOI: 10.1016/S0956-5663(03)00258-6.

GUPTA MN, RAGHAVA S. Enzyme stabilization via cross-linked enzyme aggregates. In: Shelley DM, editor. Enzyme stabilization and immobilization: methods and protocols, methods in molecular biology. **NewYork: Springer Science Business Media, LLC**; 2011. p. 133–45.

GUPTA, R; GIGRAS, P; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry** 38 (2003) 1599-1616.

GUPTA, R; GIGRAS, P; MOHAPATRA, H; GOSWAMI, V.K; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry** 38 (2003) 1599-1616.

H.U. REHMAN, A. AMAN, A. SILIPO, S.A.U. QADER, A. MOLINARO, A. ANSARI, **Food Chem.** 139 (2013) 1081–1086.

HABERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. Processos de separação por membranas. **Rio de Janeiro: E-papers**, 2006.

HADNADEV, T. D.; TORBICA, A.; HADNADEV, M. Rheological properties of wheat flour substitutes / alternative crops assessed by Mixolab®. **Procedia Food Science**, v.1, p. 328-334, 2011.

HAMER RJ. Enzymes in the baking industry. In: Tucker GA, Woods LFJ, editors. Enzymes in food processing. **Galsgow: Blackie Academic and Professional**, 1995:190-222.

HASHEMI, M., RAZAVI, S. H., SHOJAOSADATI, S. A., MOUSAVI, S. M., KHAJEH, K., SAFARI, M. Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. **Journal of Bioscience and Bioengineering** vol. 110 no. 3, 333–337, 2010.

HEMALATHA, M. S., LEELAVATHI, K., PRASADA RAO, U. J. S., & SALIMATH, P. V. (2010). Influence of amylases and xylanases on chemical, sensory, amylograph properties and microstructure of chapati. **LWT-Food Science and Technology**, 43, 1394–1402.

HENDRIKSEN HV, PEDERSEN S, BISGARD-FRANTZEN H. A process for textile warp sizing using enzymatically modified starches. 1999. **Patent Application WO** 99/35325.

HIROAKI MAEDA, XIA ZHU, KAZUNOBU OMURA, SHIHO SUZUKI AND SHINICHI KITAMURA. Effects of an exopolysaccharide (kefir) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. **BioFactors** 22(2004)197–200

HL CHEN , YT TUNG , CH CHUANG , ET AL. (2015) Kefir improves bone mass and microarchitecture in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. **Osteoporos Int** 26, 589–599.

HM CHERRY, T HUSSAIN, MN ANWAR. Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*. **Pak. J. Biol. Sci**, 2004.

HMIDET, N.; EL-HADJ ALI, N.; HADDAR, A.; KANOUN, S.; ALYA, S.; NASRI, M. (2009). Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochemical Engineering Journal** 47, 71-79.

HOBBS L. 2009. Sweeteners from starch: production, properties and uses. In J. N. BeMiller & R. L. Whistler (eds.), *Starch: Chemistry and Technology* 3rd Ed. **Academic Press, Elsevier, London**, p. 797-832.

HOWELL, J. A.; SANCHEZ, V.; FIELD, R. W. (1993), *Membranes in bioprocessing: theory and applications*. **1st edition, Chapman and Hall**.

HUANG, Y., WU, F., WANG, X., SUI, Y., YANG, L., & WANG, J. (2013). Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: A potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. **Journal of Dairy Science**, 96, 2816–2825.

INDRANI, D.; RAO, G. V. Rheological characteristics of wheat flour dough as influenced by ingredients of Parotta, v. 17, n. 1, p. 110-105, 2007.

IPSITA ROY, M. S. R. SASTRY, B. N. JOHRI AND MUNISHWAR N. GUPTA. Purification of α -Amylase Isoenzymes from *Scytalidium thermophilum* on a Fluidized Bed of Alginate Beads Followed by Concanavalin A–Agarose Column Chromatography. **Protein Expression and Purification** 20, 162–168 (2000).

J.A. GRAY, J.N. BEMILLER. Bread Staling: Molecular Basis and Control. **Food Science and Food Safety** · January 2003.

J.D. BLOOM, M.M. MEYER, P. MEINHOLD, C.R. OTEY, D. MACMILLAN, F.H. ARNOLD. Evolving strategies for enzyme engineering. Vol.15 (2005) p.447-452.

JEAN-CAUDE BWANGANGA TAWABA., F. BÉRA., P. THONART. Optimizing red sorghum malt quality when *Bacillus subtilis* is used during steeping to control mould growth. 2012. Volume 118 Pages 295–304.

JENSEN, B., OLSEN, J., 2003. Physicochemical properties of a purified α -amylase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology** 14, 112–116.

JIN, B., VAN LEEUWEN, J.H., PATEL, B., 1999. Mycelial morphology and fungal pro-teins production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. **Process Biochem.** 34, 335–340.

JINGLIN FU, JEREMY REINHOLD, AND NEAL W. WOODBURY. Peptide-Modified Surfaces for Enzyme Immobilization. **PLoS One**. 2011; 6(4): e18692.

JOANA PAULA MENEZES BIAZUS , JOSÉ CARLOS CURVELO SANTANA, ROBERTO RODRIGUES DE SOUZA, ELIAS BASILE TAMBOURGI. Purification of

amylases from Zea mays malt. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, 30(1): 218-223, jan.-mar. 2010

JOO, H.S., CHANG, C.S., 2005. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochem.** 40, 1263–1270.

JUAN CARLOS ROSSI-ALVA, MARIA HELENA MIGUEZ ROCHA-LEÃO. A strategic study using mutant-strain entrapment in calcium alginate for the production of *Saccharomyces cerevisiae* cells with high invertase activity. Volume 38, (2003), p.43–51.

K.C. GULLA, M.D. GOUDA, M.S. THAKUR, N.G. KARANTH. Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. **Biosensors and Bioelectronics**. Vol.19, (2004), p. 621–625

KATARZYNA SAMBORSKA, DOROTA WITROWA-RAJCHERT, ANDRÉ GONÇALVES. Spray-Drying of α -Amylase—The Effect of Process Variables on the Enzyme Inactivation. Pages 941-953 - Published online: 06 Feb 2007.

KATZ, J.R. (1928). Gelatinization and retrogradation of starch in relation to the problem of bread staling. In: **A comprehensive survey of starch chemistry**. Ed. R.P. Walton, pp 100-117. New York, USA: The Chemical Catalog Company.

KHAKIMOV, B, JESPERSEN, B. P. M. & ENGELSEN, S. B. 2014, Comprehensive and comparative metabolomic profiling of wheat, barley, oat and rye using gas chromatography-mass spectrometry and advanced chemometrics. **Foods**, vol 3, no. 4, pp. 569-585. DOI: 10.3390/foods3040569.

KILIKIAN, BEATRIZ VAHAN. Production of glucoamylase by fed-batch culture of *Aspergillus awamori* NRRL3112. **Rev. Microbiologia**; 27(2):137-141 (1996).

KING, V. A. E AND R. R. ZALL 1983a. Ethanol fermentation of whey using polyacrylamide and kappa-carrageenan entrapped yeasts. **Journal of General Applied Microbiology** 29. 379-93.

KING, V. A. E AND R. R. ZALL 1983b. Ethanol fermentation of whey using calcium alginate entrapped yeasts. **Process Biochemistry** (December), 17-20.

KOLAWOLE AND COLLEAGUES. Purification and characterization of alkaline-stable beta-amylase in malted African finger millet (*Eleusine coracana*). **Process Biochemistry**. 2011; 46(11):2178-2186.

KULP, K., & PONTE, J. G. (1981). Staling of white pan bread: Fundamental causes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 15, 1–48.

KUMAGAI, Y., SATOH, T., INOUE, A., OJIMA, T. (2013). Enzymatic properties and primary structures of two α -amylase isozymes from the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 164 (2013) 80–88

KUMARI A, KAYASTHA AM (2011). Immobilization of soybean (Glycine max) α -amylase onto chitosan and amberlite MB-150 beads: optimization and characterization. **J Mol Catal B-Enzym** 69:8–14.

L. WILSON, J.M. PALOMO, G. FERNÁNDEZ-LORENTE, A. ILLANES, J.M. GUISÁN, R. FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from *Alcaligenes* sp. Via strong adsorption on hydrophobic supports, **Enzyme Microb. Technol.** 38 (2006) 975–980.

L.K. BOWLES, Amylolytic enzymes, in: R.E. Hebeda, H.F. Zobel (Eds.), *Baked Goods Freshness, Technology, Evaluation, and Inhibition of Staling*, **Marcel Dekker, New York**, 1996, pp. 105–129.

L.P. DONINI, E. BERNARDI, E. MINOTTO, J.S. DO NASCIMENTO. Desenvolvimento in vitro de *Pleurotus* spp. Sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v.72, n.3, p.331-338, jul./set., 2005.

LEMOES, J. L. S.; BON, E. P. S.; SANTANA, M. D. F. E.; PEREIRA, N. Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n.3, p. 206–211, 2000.

LE-TIEN, C. MILLETTE M, MATEESCU MA AND LACROIX M (2004). Modified alginate and chitosan for lactic acid bacteria immobilization. **Biotechnol Appl Biochem**, 39, 347-354.

LI C, LI W, CHEN X, FENG M, RUI X, JIANG M, DONG M (2014) Microbiological, physicochemical and rheological properties of fermented soymilk produced with exopolysaccharide (EPS) producing lactic acid bacteria strains. **LWT-Food Sci Technol** 57(2):477–485.

LI Y., LIU T.-J., HE G.-Q. (2015). Antioxidant activity of peptides from fermented milk with mix culture of lactic acid bacteria and yeast. **Adv. J. Food Sci. Technol.** 7 422–427.

LIN, L.L., HSU, W.H., CHU, W.S., 1997. A gene encoding for α -amylase From thermophilic *Bacillus* sp. Strain TS-23 And its expression in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology** 82, 325–334.

LINA M. BLANDÓN, GERMAN A. ISLAN, GUILLERMO R. CASTRO, MIGUEL D. NOSEDA, VANETE THOMAZ-SOCCOL, CARLOS R. SOCCOL. Kefiran-alginate gel microspheres for oral delivery of ciprofloxacin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Volume 145, 1 September 2016, Pages 706–715.

LOPITZ-OTSOA F, REMENTERIA A, ELGUEZABAL N, GARAIZAR J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Rev Iberoam Micol.** 2006;23:67–74. [PubMed]

LUCAS, T. I.; BISHARA, R. H.; SEEVERS, R. H. A stability program for the distribution of drug products. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 68-73, 2004.

LUO, H.P.; AL-DAHMAN, M.H. Macro-mixing in draft-tube airlift bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 63, p. 1572-1585, 2008.

M. ANTONIA MARTÍNEZ-ANAYA, TERESA JIMÉNEZ. Rheological properties of enzyme supplemented doughs. Volume 28, Issue 5 November 1997 Pages 569–583.

M. SABAN TANYILDIZI , DURSUN ÖZER, MURAT ELIBOL. Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. **Process Biochemistry**. Volume 40, Issue 7, June 2005, Pages 2291–2296.

M.J.E.C. VAN DER MAAREL, B. VAN DER VEEN, J.C.M. UITDEHAAG, H. LEEMHUIS, L. DIJKHUIZEN, Properties and application of starch-converting enzymes of the α -amylase family, **J. Biotechnol.** 94 (2002) 137–155.

M.S. HEMALATHA., LEELAVATHI KRISHNARAU. Influence of amylases and xylanase on chemical, sensory, amylograph properties and microstructure of chapatti. **Article in LWT- Food Science and Technology** 43(9):1394-1402 (2010).

M.S. MOHY ELDIN, Y.A. AGGOUR, M.R. EL-AASSAR, G.E. BEGHET & R.R. ATTA. Development of nano-crosslinked polyacrylonitrile ions exchanger particles for dyes removal. **Desalination and Water Treatment**. Pages 4255-4266 – 2015.

MABEL SALAS HERNÁNDEZ, MARILÚ RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, NELSON PÉREZ GUERRA, RENATO PÉREZ . Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. **Journal of Food Engineering**. Volume 73, Issue 1, March 2006, Pages 93–100.

MACHADO CM, SOCCOL CR, DE OLIVEIRA BH, PANDEY A (2002) Gibberellic acid production by solid-state fermentation in coffee husk. **Appl Biochem Biotechnol** 102–103:179–191.

MACHADO, C. M. M. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – ga3) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: relação da produção de ga3 em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná**, 2002. 95 p

MAEDA, T., HASHIMOTO, T., MINODA, M., TAMAGAWA, S., & MORITA, N. (2003). Effects of mutant thermostable α -amylase on rheological properties of wheat dough and bread. **Cereal Chemistry**, 80, 722–727.

MAGALHÃES KT, PEREIRA GVM, DIAS DR, SCHWAN RF. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World J Microbiol Biotechnol**. 2010a;26:1241–1250.[PubMed].

MAITY, C., SAMANTA, S., HALDER, S.K., DAS MOHAPATRA, P.K., PATI, B.R., MONDAL, K.C., 2011. Isozymes Of α -amylases From newly Isolated *Bacillus Thuringiensis* CKB19: Production from immobilized cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** 16, 312–319.

MARC J.E.C VAN DER MAAREL, BART VAN DER VEEN, JOOST C.M UITDEHAAG, HANS LEEMHUIS, L DIJKHUIZEN. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal of Biotechnology**. Volume 94, (2002), Pages 137–155.

MARCO SANTORELLI, LUISA MAURELLI, GABRIELLA POCSFALVI, IMMACOLATA FIUME, GIUSEPPE SQUILLACI, FRANCESCO LA CARA, GIOVANNI DEL MONACO, ALESSANDRA MORANA. Isolation and characterization of a novel alpha-amylase from the extreme haloarchaeon *Haloterrigena Turkmenica*. **International Journal of Biological Macromolecules** 92 (2016) 174–184.

MARIA R. PRADO, LINA MARCELA BLANDÓN, LUCIANA P. S. VANDENBERGHE, CRISTINE RODRIGUES, GUILLERMO R. CASTRO, VANETE THOMAZ-SOCCOL AND CARLOS R. SOCCOL. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in Microbiology**. 30 October 2015.

MARKETS AND MARKETS, 2014. **Found on PR Newswire**, 1 Mar 2014, (Website: <http://www.prnewswire.com>)

MARTÍNEZ-ANAYA, M. A., & JIMÉNEZ, T. (1997). Functionality of enzymes that hydrolyse starch and non-starch polysaccharide in breadmaking. **Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, 205, 209–214.

MASTERS K 1985. *Spray Drying Handbook*. 4. ed. **Londres**: George Godwin.
MEDHA RANA, AMITA KUMARI, GHANSHYAM S. CHAUHAN, KALPANA CHAUHAN. Modified chitosan microspheres in non-aggregated amylase immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules** Volume 66, May 2014, Pages 46–51.

MEHRNOUSH AMID, MOHD YAZID ABD MANAP. Purification and characterisation of a novel amylase enzyme from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. **Food Chemistry**. Volume 165, 15 December 2014, Pages 412–418.

MILLER GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem** 31:426–429.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**. v. 31, p. 426-428, 1957.

MINAKSHI&PUNDIR, C S. Co-immobilization of lipase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate oxidase and peroxidase on to aryl amine glass beads affixed on plastic strip for determination of triglycerides in serum. Vol.45(2) (2008).

MITIDIERI, S.; SOUZA MARTINELLI, A.H.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresour Technol** 97, 1217-1224.

MÓDENES, A. N.; SILVA, A. M.; TRIGUEROS, D. E. G. Avaliação das propriedades reológicas do trigo armazenado. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 29, n.3, p.508-512, 2009.

MOE ST, DRAGET KI, SKJAK-BRAEK G, ET AL. Alginates. In: Stephen AM, editor. Food polysaccharides and their applications. **New York: Marcel Dekker**; 1995. pp. 245–86.

MOHSEN MOBINI-DEHKORDI, FAHIME AFZAL JAVAN. Application of alpha-amylase in biotechnology. J. Biol. **Today's World**. 2012 Nov; 1 (1): 15-20

MONGA M, GOYAL M, KALRA KL, SONI G. 2011 – Production and stabilization of amylases from *Aspergillus niger* Mycosphere 2(2), 129–134.

MORAES, L.M.P.; FILHO, S.A.; ULHOA, C.J. (1999). Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 15, 561-564.

MORAES, L.M.P.; FILHO, S.A.; ULHOA, C.J. (1999). Purification and some properties of an α -amylase glucoamylase fusion protein from *Saccharomyces cerevisiae*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 15, 561-564.

MUHAMMAD ASIF NAWAZ, HANEEF UR REHMAN, ZAINAB BIBI, AFSHEEN AMAN, SHAH ALI UL QADER. Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix. **Biochemistry and Biophysics Reports** 4 (2015) 250–256

NAJAFPOUR, G.D Biochemical Engineering and biotechnology. **1 ed. Amsterdam: Elsevier B.V**, 2007, 421p

NIVEDITA JAISWAL, OM PRAKASH, MAHE TALAT, S.H. HASAN, RAJESH KUMAR PANDEY. α -Amylase immobilization on gelatin: Optimization of process

variables. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** Volume 10, Issue 1, June 2012, Pages 161–167

NOEL, M.; COMBES, D. Rhizomucor miehei lipase: Differential scanning calorimetry and pressure/temperature stability studies in presence of soluble additives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 2-3, p. 299–308, 2003.

NS REDDY, ANNAPOORNA NIMMAGADDA, K. R. S. SAMBASIVA RAO. *An overview of the microbial α -amylase family*. **African Journal of Biotechnology** Vol. 2 (12), pp. 645-648, (2003).

OLAOYE, O. S.; KOLAWOLE, O. S. Modeling of the kinetic of ethanol formation from glucose biomass in batch culture with a non structured model. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 3, n. 4, p. 562-565, 2013.

ÖLÇER, Z.; TANRIVESEN, A. Co-immobilization of dextransucrase and dextranase in alginate. **Process Biochemistry**, 45:1645–1651, 2010.

OLE KIRK, TORBEN VEDEL BORCHERT, CLAUS CRONE FUGLSANG. **Industrial enzyme applications**. Vol.13 (2002), p. 345-351.

OLGA LUISA TAVANOA, ROBERTO FERNANDEZ-LAFUENTE, ANTONIO JOSÉ GOULART, RUBENS MONTI. Optimization of the immobilization of sweet potato amylase using glutaraldehyde-agarose support. Characterization of the immobilized enzyme. **Process Biochemistry** 48 (2013) 1054–1058.

OLIVEIRA, J. Produção de ácido giberélico por fermentação submersa e por fermentação no estado semissólido em diferentes modelos de biorreatores utilizando polpa cítrica. **Dissertação de Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia**. Universidade Federal do Paraná, 2012. 129 p.

ÖNER, E.T. (2006). Optimization of ethanol production from starch by an amylolytic nuclear petite *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast** 23, 849-856.

OSTROSKY, E. A. ET AL. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória CMI de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301-307, mar. 2008.

P. BERNFELD, Enzymes of starch degradation and synthesis, Adv. **Enzymol.** 12, (1951) 397–427.

P. FERNANDES. Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts. Volume 2010 (2010), Article ID 862537, 19 pages.
PANDEY A, NIGAM P, SOCCOL CR, SOCCOL VT, SINGH D, MOHAN R. Advances in microbial amylases. **Biotechnol Appl Biochem** 2000;31:135-52.

PANDEY A, RAMACHANDRAN S. GENERAL INTRODUCTION. IN: PANDEY A, WEBB C, SOCCOL CR, LARROCHE C. **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech Publishers; 2005. p. 1–10.

PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C.R., SOCCOL, T.V., SINGH, D., MOHAN, R., 2000. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry** 31, 135–152.

PANDEY, A; SOCCOL, C.R; RODRIGUEZ-LEON, J.A; NIGAM, P. Solid-State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications, **Asiatec Publishers Inc, New Delhi**, 2001, 221p.

PANDEY; P. BINOD; P. PIYUSH; G. RAGHAVENDRA; N. K. MADHAVAN; D. ARVIND; D. KAKALLI. Industrial Enzymes - Present status and future perspectives for India. **JSIR Vol.72(05) [May 2013] 271-286**

PAZHANG, M., MEHRNEJAD, F., PAZHANG, Y., FALAHATI, H.; CHAPARZADEH, N. Effect of sorbitol and glycerol on the stability of trypsin and difference between their stabilization effects in the various solvents. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. 1-8, 2015. Disponivel em: Wiley Online Library.

PETER R SHEWRY, NIGEL G HALFORD, PETER S BELTON, AND ARTHUR S TATHAM. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 2002 Feb 28; 357(1418): 133–142.

PETERSEN, E.; MARGARITIS, A. Hydrodynamic and mass transfer characteristics of three-phase gaslift bioreactor systems. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 21, p. 233-294, 2001.

POLIEZI M.L.T.M., RIZZATTI A.C.S., MONTI R., TRENZI H.F., JORGE J.A., AMORIN D.S. (2005). Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 67: 557-591.

POLIZELI ML, RIZZATTI AC, MONTI R, TERNZI HF, JORGE JA, AMORIM DS. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**. 2005 Jun;67(5):577-91.

PORRAS-SAAVEDRA, J.; PALACIOS-GONZÁLEZ, E.; LARTUNDO-ROJAS, L.; et al. Microstructural properties and distribution of components in microparticles obtained by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, v. 152, p. 105–112, 2015.

PRADO MR, BLANDÓN LM, VANDENBERGHE LPS, RODRIGUES C, CASTRO GR, THOMAZ-SOCCOL V AND SOCCOL CR (2015) Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Front. Microbiol.** 6:1177. doi: 10.3389/fmicb.2015.01177

PURHAGEN, J.K., SJOO, M.F., ELIASSON, A.C., 2011. The use of normal and heat-treated barley flour and waxy barley starch as anti-staling agents in laboratory and industrial baking processes. **Jornal Food Eng.** 104,. 414-421.

QUNHUI WANG, XIAOQIANG WANGA, XUMING WANGC, HONGZHI MA. Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. **Process Biochemistry** 43 (2008) 280–286

R. KAMMOUN, B. NAILI, S. BEJAR, Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product), *Bioresour. Technol.* 99 (13) (2008) 5602–5609.

R. KAMMOUN, B. NAILI, S. BEJAR, BIORESOUR. **Technol.** 99 (13) (2008) 5602–5609.

R. KAMMOUN., B. NAILI., S. BEJAR. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology**. Volume 99 (2008), Pages 5602–5609.

RADHOUANE KAMMOUN, BELGACEM NAILI, SAMIR BEJAR. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for a-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). **Bioresource Technology** 99 (2008) 5602–5609.

RADHOUANE KAMMOUN*, HICHEM CHOUAYEKH, HAJEUR ABID, BELGACEM NAILI, SAMIR BEJAR. Purification of CBS 819.72 α -amylase by aqueous two-phase systems: Modelling using Response Surface Methodology. **Biochemical Engineering Journal** 46 (2009) 306–312

RAHMATH ABDULLA, POGAKU RAVINDRA. Immobilized *Burkholderia cepacia* lipase for biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. oil. **Biomass and Bioenergy**. Volume 56, September 2013, Pages 8–13.

RAJENDRA KUMAR SAXENA, KAKOLI DUTT, LATA AGARWAL, PREETI NAYYAR. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. **Bioresource Technology** Volume 98, Issue 2, January 2007, Pages 260–26.

RAMESH, M.V., LONSANE, B.K., 1989. Solid state fermentation for production of higher titers of thermostable α -amylase with two peaks for pH optima by *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters** 11, 49–52.

RANUM, P., & DESTEFANIS, V. A. (1990). Use of fungal α -amylase in milling and baking. **Cereal Food World**, 35, 931–933.

RATTRAY FP, O'CONNELL MJ. Fermented Milks Kefir. In: Fukay JW, editor. Encyclopedia of Dairy Sciences. 2th ed. **Academic Press; San Diego, USA**: 2011. pp. 518–524.

REA MC, LENNARTSSON T, DILLON P, DRINA FD, REVILLE WJ, HEAPES M, COGAN TM. Irish kefir-like grains : their structure, microbial composition and fermentation kinetics. **J Appl Microbiol**. 1996;8:83–94.

REYNOLDS, D. W.; FACCHINE, K. L.; MULLANEY, F. J.; ALSANTE, K. M. HATAJIK, T. D.; MICHEL, M. G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, n. 2, p. 48-56, 2002.

RIMADA, P. S., & ABRAHAM, A. G. (2003) Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey. **Lait**, 83(1), 79-87.

ROBYT JF. 2009. Enzymes and their action on starch. In J. N. BeMiller & R. L. Whistler (eds.), Starch: Chemistry and Technology **3rd Ed. Academic Press, Elsevier, London**, p. 238-292.

RODRIGUES, A. A. Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats. 2009. **Dissertação (Mestrado em Concentração de Microbiologia)–Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia**, 2009.

ROGALSKI, J.; SZCZODRAK, J.; PLESZCZYHKA, M.; FIEDUREK, J. Immobilisation and kinetics of *Penicillium notatum* dextranase on controlled porous glass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 3:271-283, 1997.

ROOHI, KUDDUS, M., Bio-statistical approach for optimization of cold-active α -amylase production by novel psychrotolerant *M. foliorum* GA2 in solid state fermentation. **Biocatal. Agric. Biotechnol** (2013).

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 30, p. 126-131, jan./mar. 2010.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6. ed. Washington: **Pharmaceutical Press**, 2009.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 6. ed. Washington: **Pharmaceutical Press**, 2009.

RUSHIT J. SHUKLA, SATYA P. SINGH. Structural and catalytic properties of immobilized α -amylase from *Laceyella sacchari* TSI-2. **International Journal of Biological Macromolecules**. Volume 85, April 2016, Pages 208–216.

S. ALI, Z. HOSSAIN. Characteristics of glucoamylase from *Aspergillus terreus*. **Applied Microbiology**. Volume 71, (1991). P.144–146

S. DJEKIRIF-DAKHMOUCHE, Z. GHERIBI-AOULMI, Z. MERAIHI, L. BENNAMOUN. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Engineering**. Volume 73, Issue 2, March 2006, Pages 190–197.

S. DJEKIRIF-DAKHMOUCHE., Z. GHERIBI-AOULMI., Z. MERAIHI., L. BENNAMOUN. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Journal of Food Engineering**. Volume 73, (2006), Pages 190–197.

S. SHAFAT, M. AKRAM AND A. REHMAN. Isolation and characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus subtilis*., **African Journal of Microbiology Research** Vol. 5(20), pp. 3334-3338, 30 September, 2011.

S.R. WEIJERS, K. VAN'T RIET. Enzyme stability in downstream processing part 1: Enzyme inactivation, stability and stabilization. **Biotechnology Advances**. Volume 10, Issue 2, 1992, Pages 237-249.

SÁ, I. S; CABRAL, L. M. C.; MATTA, V. M. (2003), Concentration of Pineapple Juice by Membrane Separation Processes. **Brazilian Journal of Food Technology**, 6 (1), 53-62.

SAIDEHAFRISHAM, ARASTOOBADOEI-DALFARD, ABDOLHAMIDNAMAKI-SHOUSHTARI, ZAHRAKARAMI. Characterization of a thermostable, CaCl_2 -activated and raw-starch hydrolyzing α -amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid state fermentation by utilizing agricultural wastes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 132(2016)98–106.

SAMBORSKA, K., 2007. Enhancement of thermal stability of *Aspergillus oryzae* α -amylase using stabilizing additives. **Acta Agroph.**, 9(1): 233-244.

SÁ-PEREIRA, P.; PAVEIA, H.; COSTA-FERREIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. A new look at xylanases: An overview of purification strategies. **Molecular Biotechnology**, v. 24, p. 257-281, 2003.

SATAR R, MATTO M, HUSAIN Q. (2008) Studies on calcium alginate–pectin gel entrapped concanavalin A–bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase complex. **J Sci Ind Res India** 67:609–615.

SEYHAN F, TIJSKENS L M M AND EVRANUZ O (2002) Modeling temperature and pH dependence of lipase and peroxidase activity in Turkish hazelnuts. **Journal of Food Engineering** 52: 387–395.

SHARMA, A., SATYANARAYANA, T. (2012). Microbial acid-stable α -amylases: Characteristics, genetic engineering and applications.

Shaw FV 1997. Spray drying as an alternative granulation technique. In: Parikj DM. Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology. **Nova York: Marcel Dekker**, p. 75-96.

SHUANG LI, XIAOFENG YANG, SHUAI YANG, MUZI ZHU, XIAONING WANG. TECHNOLOGY PROSPECTING ON ENZYMES: **APPLICATION, MARKETING AND ENGINEERING**. Volume No: 2, Issue: 3, (2012)

SI, J. Q. (1997). Synergistic effect of enzymes for breadbaking. **Cereal Foods World**, 42, 802–807.

SIVARAMAKRISHNAN, S., GANGADHARAN, D., NAMPOOTHIRI, K. M., SOCCOL, C. R., & PANDEY, A. (2006). α -Amylases from microbial sources – an overview on recent developments. **Food Technology and Biotechnology**, 44, 173–184.

SMIDSROD O, SKJAK-BRAEK G (1990). Alginate for cell immobilization. **Trends in Food Sci Technol**. 8: 71-75.

Soccol, C.R. (1992). Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée, en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L(+) lactique. **PhD Thesis, Université Technologique de Compiègne, France**, pp. 219.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industryBraz. **J. Microbiol.** vol.41 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2010.

STANLEY P. CAUVAIN. Author links open the author workspace.Norman Chamberlain. The bread improving effect of fungal α -amylase. **Journal of Cereal Science**Volume 8, Issue 3, November 1988, Pages 239-248.

STRAATHOF, A.J. J. (2011). The proportion of downstream costs in fermentative production processes. In M. Moo-Young (Ed. in chief), *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 2, (2nd ed.) (pp. 811–814). **Oxford: Elsevier**.

SUSANTO, H.; ULBRICHT, M. Characteristics, performance and stability of polyethersulfone ultrafiltration membranes prepared by phase separation method using different macromolecular additives. **Journal of Membrane Science**, v. 327, p. 125-135, 2009.

SWATI B. JADHAV, REKHA S. SINGHA. Pullulan-complexed α -amylase and glucosidase in alginate beads: Enhanced entrapment and stability. **Carbohydrate Polymers**. Vol.105, (2014), p. 49–56

SWATI B. JADHAV, REKHA S. SINGHA. Pullulan-complexed α -amylase and glucosidase in alginate beads: Enhanced entrapment and stability. **Carbohydrate Polymers**. Vol.105, (2014), p. 49–56

SYDNEI MITIDIERI, ANNE HELENE SOUZA MARTINELLIA, AUGUSTO SCHRANKA, MARILENE HENNING VAINSTEIN. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology** 97 (2006) 1217–1224

TALEKAR, S., & CHAVARE, S. (2012). Optimization of immobilization of α -amylase in alginate gel and its comparative biochemical studies with free α -amylase. **Recent Research in Science and Technology**, 4(2), 1–5.

TAMIME AY. Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products. In: Tamime AY, editor. Fermented Milk. Blackwell Science Ltd; Oxford, UK: 2006. pp. 174–216.

TANGPHATSORNRUANG, S., NACONSIE, M., THAMMARONGTHAM, C., & NARANGAJAVANA, J. (2005). Isolation and characterization of an α -amylase gene in cassava (*Manihot esculenta*). **Plant Physiology and Biochemistry**, 43, 821–827.

TAPATI BHANJA DEYN, RINTU BANERJEE - Purification, biochemical characterization and application of α -amylase produced by *Aspergillus oryzae* IFO-30103 - **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 4 (2015) 83–90.

TAPATI BHANJA, S. ROUT, RINTU BANERJEE, B. C. BHATTACHARYYA. Comparative profiles of α -amylase production in conventional tray reactor and GROWTEK bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 2007, Volume 30, Issue 5, pp 369–376.

TIWARI, A.; BHAT, R. Stabilization of yeast hexokinase A by polyol osmolytes: Correlation with the physicochemical properties of aqueous solutions. **Biophysical Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 90–99, 2006.

TONON, R. V.; BARONI, A. F.; BRABET, C.; GILBERT, O.; PALLET, D.; HUBINGER, M. D. Water sorption and glass transition temperature of spray dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice. **Journal of Food Engineering**, v. 94, n. 3-4, p. 215–221, 2009a.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açai em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 444–450, 2009b.

TURBIANI, F. R. B. e KIECKBUSCH, T. G. Mechanical and barrier properties of sodium alginate films obtained using calcium benzoate and/or calcium chloride as the crosslinking agent. **Braz. J. Food Technol., Campinas**, v. 14, n. 2, p. 82-90, abr./jun. 2011.

V. RANA; A. D. ECKARD; P. TELLER; B. K. AHRING. On-site enzymes produced from *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus saccharolyticus* for hydrolysis of wet exploded corn stover and loblolly pine. V.154 (2014), p. 282-289.

V.V. MOZHAEV., KAREL MARTINEK. Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. **Enzyme and Microbial Technology** Vol. 6, (1984), p. 50-59.

VAN DAM, H. W.; HILLE, J. D. R. Yeast and enzymes in breadmaking. **Cereal Foods World, Saint Paul**, v. 37, n. 3, p. 245-252, mar. 1992.

VELINGS N. & MESTDAGH M., 1995. Physico-chemical properties of alginate gel beads. **Polym. Gels Networks**, **3**, 311-330.

VIHINEN M, MANTSALA P (1989). Microbial amylolytic enzymes. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** 24:329- 418.

VITOLO, M. 2001. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Coords.). Biotecnologia na produção de alimentos. **São Paulo: Edgard Blücher Ltda.**, 2001. p. 387-420.

WANG SY, HO YF, CHEN YP, CHEN MJ (2015). Effects of a novel encapsulating technique on the temperature tolerance and anti-colitis activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus kefiranofaciens* M1. **Food Microbiol** 46:494–500.

WANG, J., XIAO, Z., ZHENG, T., YANG, Y., & YANG, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet kefir. **Carbohydrate Polymers**, 125, 16–25.

WEE S, GOMBOTZ WR. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**.1998 May 4;31(3):267-285.

WIM J. Quax. Bacterial Enzymes. **Prokaryotes** (2006) 1:777-796

XU DONG LIU, YAN XU. A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education and School of Biotechnology, **Southern Yangtze University, Wuxi** 214036 (2007).

XU DONG LIU, YAN XU. A novel raw starch digesting α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: Purification and characterization. **Bioresource Technology**. Volume 99, Issue 10, July 2008, Pages 4315–4320.

XU, J.; BIETZ, J. A.; CARRIERE, C. V. Viscoelastic properties of wheat gliadin and gluten suspension. **Food Chem., Reading**, v. 101, n. 3, p. 1025-1030, 2007.

YADAV, J. K.; PRAKASH, V. Stabilization of α -Amylase, the Key Enzyme in Carbohydrates Properties Alterations, at Low pH. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 6, p. 1182–1196, 2011.

YANG CH, LIU WH. Purification and properties of a maltotrioseproducing alphaamylase from *Thermobifida fusca*. **Enzyme Microb Technol** 2004;35:254–60.

YANG CH, LIU WH. Purification and properties of a maltotrioseproducing alphaamylase from *Thermobifida fusca*. **Enzyme Microb Technol** 2004;35:254–60.

YE, W. N.; COMBES, D. MONSAN, P. Influence of additives on the thermostability of glucose oxidase. **Enzyme Microbial Technology**, v. 10, p. 498-502, 1988.

YEKTA GÖKSUNGUR, NEŞE ZORLU. Production of Ethanol from Beet Molasses by Ca-Alginate Immobilized Yeast Cells in a Packed-Bed Bioreactor. 25 (2001) 265-275.

YUSUF CHISTI, MURRAY MOO-YOUNG. On the calculation of shear rate and apparent viscosity in airlift and bubble column bioreactors. **Biotechnology and bioengineering**. Vol. 34, p.1391-1392 (1989).

Z. BIBI, F. SHAHID, S.A.U. QADER, A. AMAN. Agar–agar entrapment increases the stability of endo- β -1,4-xylanase for repeated biodegradation of xylan. **Int. J. Biol. Macromol.** 75 (2015) 121–127

ZOE KONSOUOLA, MARIA LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES. Thermostable α -amylase production by *Bacillus subtilis* entrapped in calcium alginate gel capsules. **Enzyme and Microbial Technology** 39 (2006) 690–696.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Assugestões para pesquisas futuras são apresentadas a seguir e abrem possibilidades para a exploração de novos temas relacionados ao estudo de amilases:

- Buscar maior efetividade na estabilidade da formulação do produto em pó;
- Avaliar as esferas imobilizadas por mais ciclos de reuso;
- Fazer aplicação da enzima imobilizada;
- Avaliar o custo do processo de produção da enzima;
- Estudos de estabilidade da amilase produzida neste trabalho em diferentes embalagens;
- Estudos de formulações e associação da amilase produzida com outras enzimas interessantes ao processo de produção de alimentos.